

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

**Estudo comparativo da ação da saliva de triatomíneos
(Heteroptera: Reduviidae) e do predador *Belostoma anurum*
(Heteroptera: Belostomatidae) sobre as preparações de nervo
isolado de *Rattus norvegicus* e de vaso dorsal de *Rhodnius prolixus***

Ceres Luciana Alves

Belo Horizonte
2007

Ceres Luciana Alves

**Estudo comparativo da ação da saliva de triatomíneos
(Heteroptera: Reduviidae) e do predador *Belostoma anurum*
(Heteroptera: Belostomatidae) sobre as preparações de nervo
isolado de *Rattus norvegicus* e de vaso dorsal de *Rhodnius prolixus***

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

Área de Concentração : Entomologia
Orientador: Prof. Marcos Horácio Pereira
Co-Orientador: Prof. Nelder de F. Gontijo
Universidade Federal de Minas Gerais

**Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos
Departamento de Parasitologia – ICB -UFMG**

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2007

043

A474e

Alves, Ceres Luciana

Estudo comparativo da ação da saliva de triatomíneos (Heteroptera: Reduviidae) e do predador *Belostoma anurum* (Heteroptera: Belostomatidae) sobre as preparações de nervo isolado de *Rattus norvegicus* e de vaso dorsal de *Rhodnius prolixus*. [manuscrito] / Ceres Luciana Alves. – 2007.

94 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Marcos Horácio Pereira. Co-orientador: Nelder de Figueiredo Gontijo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. Triatoma - Teses. 2. Panstrongylus - Teses 3. Belostoma - Teses. 4. Saliva - Teses. 5. Inibição do impulso nervoso. 6. Parasitologia – Teses. I. Pereira, Marcos Horácio. II. Gontijo, Nelder de Figueiredo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Aos meus pais e irmãos
pelo amor, incentivo,
apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

Nesta seção de agradecimentos, quero agradecer a todas as pessoas especiais que participaram de mais esta etapa da minha vida, sempre me apoiando.

Ao Professor Dr. Marcos Horácio Pereira muito obrigada pela oportunidade de fazer parte da equipe do laboratório, pela orientação desde a iniciação científica e ajuda cotidiana, pelo aprendizado constante ao longo desses anos, enfim, obrigada mesmo por tudo...

Ao Professor Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo também pela constante orientação e acompanhamento durante todos esses anos, pelas valiosas discussões e disposição para ajudar sempre que necessário.

Ao Professor Dr. Alan Lane de Melo, muito obrigada pelo apoio, colaboração, pelas discussões valiosas, críticas e importantes sugestões feitas no desenvolver desse trabalho.

Gostaria de agradecer também a todo o pessoal do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), que propiciaram um ambiente de trabalho agradabilíssimo, César, muito obrigada pela ajuda durante os experimentos. Dani, minha amiga e ex-companheira de projeto, foi ótimo trabalhar com você, valeu por tudo. Vaninha e Lú adm, vocês que além de amigas são minhas veteranas de curso e de lab., obrigada pelas dicas e pelo companheirismo, adoro vocês. As “Diabas da Taz” Adriana, Chefa, Isabella, que tornaram cada dia especial e divertido no decorrer do trabalho. Ao pessoal da antiga, Raquel, Fernanda Puc e Veruska As recém chegadas Andreza, Rafaela, Jéssica, Érika e Natasha que tornaram o clima no lab. ainda mais animado. A “ala masculina do lab.” Ricardo, Vlad, Felipe e Artur, por um cotidiano muito legal. As “forças superiores” Áurea e Mônica, pela amizade exta-LFIH construída.

À Dr. Érika Carime Borges, do LFIH, pelas importantes sugestões feitas ao trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial ao Coordenador do Curso: Professor Pedro Marcos Linardi, pelo empenho e dedicação ao curso; e à secretária do curso

de Pós-graduação em Parasitologia, “nossa querida” Sumara Aparecida G. Ferreira, pela assistência e apoio técnico e emocional.

À CAPES pela bolsa de financiamento de Mestrado.

Aos colegas de Departamento, Lara, Heloísa, Cíntia, Karina, aos Bicudos: Sílvia, Elisa, Carol e Andrey, ao pessoal do Laboratório de Culicídeos, em especial para a Ione, Jivago, Márcia, Rose, Matheus e Gigante.

À Dr. Liléia Diotaiuti e à Dr. Silvia Ermelinda Barbosa, ambas do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do IRR/FIOCRUZ, pelas importantes críticas e excelentes sugestões feitas ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do IRR/FIOCRUZ, em especial a Raquel, Rita, Alessandra e João Paulo.

Aos meus amigos de curso, em especial a AMIGA Cíntia por estar presente em muitos momentos especiais da minha vida. A AMIGA Maíra, pela ajuda constante, por ser tão especial e gente muiiiito boa.

Obrigada a todos os meus Amigos “extra-UFMG” em especial ao Clelton, Patrícia, Elisângela, Andréia, Lé, Laís, Geralda, valeu pelo apoio. Ao Léo, meu amigo dos tempos de DiamondMall, obrigada pelo incentivo durante a etapa do vestibular, se não fosse por seus conselhos eu não chegaria aqui. A Paula, minha amiga, valeu pela energia, apoio e alegria... Ao Antônio, obrigada mesmo por todo apoio, incentivo, ajuda e principalmente por sua compreensão durante esse tempão...

Agradeço à “Família Mexicana” (Turma de Mestrado 2005 – Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG) e os “Agregados”, juntos, compartilhamos momentos difíceis e alegres, acho que sem vocês tudo seria ainda mais difícil... Então vou começar pelas “Barangas do 227” – Ana Flávia – “A mais racional da turma” é companheira de estudos, McDonald’s e afins e de Mineirão, Carla Maria – “A mais brava” é companheira de choros, danças, estudos e seminários; Kelly Key – “A mais querida” é companheira de estudos, passeios turísticos e do serão noturno das fases pré e pós-tese, “Barangas” obrigada pelo companheirismo inestimável

e por todos os momentos incríveis vividos pelo nosso “quarteto fantástico” que foi formado; “O Casal” – Sydnei Leonardo “O mais picareta” e Renata Cristina “A pegadora”, vocês são os meus companheiros de estudos, conspirações, seminários e nos últimos tempos do livro da ABNT, obrigada pela amizade e cumplicidade, adoro vocês; Priscila Helena – “A mais organizada, disciplinada, é a mãe do Jorge”, e companheira de estudos e Pizzas; Fernanda Regina – “A garota Udi” companheira de estudos e do Laboratório; Camila Gabriela – “A mais gente boa” – companheira de estudos e eventos da turma; Izabela Graziela – “A gata de Botas” – companheira de estudos e da famosa carrocinha, Meninas, obrigada pela amizade , e constante apoio nos momentos difíceis.

Quero agradecer em especial à minha família, que me apoiou, durante todas as etapas da minha vida, Zoraide (Mãe), Benedito (Pai), Hertz e Geisa (Irmãos) e Daniele (Cunhada). Muito obrigada por todo amor, carinho e compreensão. Obrigada também por sonhar junto comigo, e por isso, tornar possível a realização e conquista desse sonho. Sem vocês tantos outros sonhos não seriam possíveis, valeu !!! Cherloque, Diana, Karl e Tathy, não me esqueci de vocês...

Agradeço também a Deus que tornou esse momento possível, e que está sempre presente em todos os momentos da minha vida...

*"Qualquer tolo inteligente consegue
fazer coisas maiores e mais complexas.
É necessário um toque de gênio e muita
coragem para ir na direção oposta."*

Albert Einstein

RESUMO

Realizou-se um estudo comparativo da ação da saliva de triatomíneos (*Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*) e do predador *Belostoma anurum* sobre o potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático isolado *Rattus norvegicus* e sobre a pulsação do vaso dorsal de *Rhodnius prolixus*. A saliva de *P. megistus* inibiu a amplitude do PAC do nervo isolado de rato de forma gradual e reversível. A saliva de *T. infestans* também inibiu de forma gradual a amplitude do PAC, porém de forma irreversível. Já a saliva de *B. anurum*, além de reduzir a amplitude do PAC, também interferiu nas fases de repolarização e duração. Quando a saliva das espécies *T. infestans*, *P. megistus* e *B. anurum* foi semipurificada houve uma ação inibitória de forma gradual e reversível sobre a amplitude do PAC, sem alterar as fases de repolarização e duração. Este fato sugere que as moléculas com atividade sobre o PAC, presentes na saliva destes heterópteros, são termo-resistentes e apresentam baixo peso molecular (< 5kDa). Caracterização complementar (extração de lipídeos) sugere que as moléculas bioativas de *T. infestans* e de *B. anurum* não são de natureza lipídica. A incubação da saliva semipurificada de *B. anurum* com protease inespecífica (proteínase K) não inibiu a atividade sobre o PAC, sugerindo uma natureza não protéica da molécula bioativa. Quando testadas sobre a preparação de vaso dorsal isolado de *Rhodnius prolixus*, a saliva bruta de *P. megistus* e a semipurificada de *B. anurum* produziram parada imediata dos batimentos, de forma reversível. Considerando estes parâmetros, é possível que a atividade paralisante presente na saliva dos heterópteros predadores e a atividade “anestésica-like” encontrada na saliva dos triatomíneos compartilhem as mesmas biomoléculas, que aparentemente vêm sendo mantidas na saliva desses insetos ao longo do processo de evolução. Entretanto, somente a caracterização molecular do componente responsável por estas atividades poderá confirmar definitivamente esta hipótese.

ABSTRACT

A comparative study about the action of triatomines saliva (*Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*) and the predator *Belostoma anurum* was done on the compound action potential (CAP) of nerves sciatic isolated from *Rattus norvegicus* and on the pulsation of the dorsal vessel of *Rhodnius prolixus*. The saliva of *P. megistus* inhibited the CAP amplitude from the nerve isolated from rat in a gradual and reversible way. The saliva of *T. infestans* also inhibited the CAP amplitude in a gradual but irreversible way. In addition to a decrease of the CAP amplitude, the saliva of *B. anurum* also modified the repolarization and duration of the phases. When the saliva of the species (*T. infestans*, *P. megistus* and *B. anurum*) was semi-purified, a decrease of the CAP amplitude was observed in a gradual and reversible way, without modifying the repolarization and duration of the phases of the CAP from the isolated nerve of rat. This fact suggests that the molecules with activity over the CAP, that are present in the saliva of these heteropterans, are heat-resistant and possess low molecular weight (<5 kDa). Complementary characterization (extraction of lipids) suggests that the bioactive molecules from *T. infestans* and *B. anurum* are not of lipidic nature. The incubation of semi-purified saliva from *B. anurum* with inespecific proteinase (proteinase K) did not inhibit the activity of the CAP, suggesting a non-proteic nature of the bioactive molecules. When tested on preparation of isolated dorsal vessel of *R. prolixus*, the crude saliva of *P. megistus* and semi-purified saliva of *B. anurum* produced immediate stops in the vessel beating, in a reversible way. Considering these parameters, it is possible that the paralyzing activity of the heteropterans predators and the anaesthetic-like activity found in triatomines share common biomolecules that have been kept in the saliva of these insects throughout the evolutionary process. However, only by doing the molecular characterization of the compound responsible for these activities this hypothesis could be confirmed.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esquema da rota hipotética de evolução para a hematofagia na subordem Heteroptera.	18
Figura 2 – Câmara de registros eletrofisiológicos	40
Figura 3 – Sistema de estimulação e de registro do método de ‘single sucrose-gap’.	41
Figura 4 – Detalhe do vaso dorsal de <i>R. prolixus</i> observado sob microscópio estereoscópio	50
Figura 5 – Registro típico do potencial de ação composto controle (PACc) de nervo ciático isolado de rato.	53
Figura 6 – Potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático de rato antes e após adição da saliva dos heterópteros.	56
Figura 7 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da saliva dos heterópteros.	57
Figura 8 – Potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático de rato antes e após a adição da saliva semipurificada de <i>Panstrongylus megistus</i> e <i>Belostoma anurum</i> .	59
Figura 9 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da saliva semipurificada de <i>Panstrongylus megistus</i> e <i>Belostoma anurum</i> e experimento controle.	60
Figura 10 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da saliva extraída de <i>Triatoma infestans</i> e experimento controle.	62
Figura 11 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da saliva extraída de <i>Belostoma anurum</i>	63
Figura 12 – Porcentagem de redução média do PAC observada a adição das salivas semipurificadas de <i>Belostoma anurum</i> tratadas ou não com proteinase K.	65
Figura 13 – Atividade da enzima proteinase K sobre o substrato de azocazeína	66
Figura 14 – Cromatografia de camada fina (TLC) da saliva semipurificada de <i>Triatoma infestans</i> e da saliva semipurificada de <i>Belostoma anurum</i>	67

- Figura 15** – Efeito da adição da fração (origem) da saliva semipurificada de *Triatoma infestans* após TLC, sobre o PAC de nervo isolado de rato. 69
- Figura 16** – Atividade da fração (origem) da saliva semipurificada de *Triatoma infestans* após TLC , sobre o PAC de nervo isolado de rato. 69
- Figura 17**– Atividade das frações (mancha alta e origem) da saliva semipurificada de *Belostoma anurum* após TLC, sobre o PAC de nervo isolado de rato. 71
- Figura 18** – Atividade da saliva semipurificada de *Belostoma anurum* (ensaio controle) sobre o PAC de nervo isolado de rato. 71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Secreções salivares presentes em diferentes espécies de heterópteros	22
Tabela 2 – Atividade do homogenato de glândula salivar de diferentes Hemiptera sobre a atividade cardíaca de <i>Periplaneta americana</i>	24

LISTA DE QUADRO

	Página
Quadro 1 – Efeito da saliva dos heterópteros sobre a preparação de vaso dorsal de <i>Rhodnius prolixus</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetro
Da	Dalton
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DMSO	Dimetil sulfóxido
FIG.	Figura
g	Aceleração gravitacional
Hz	Hertz
kDa	QuiloDalton
LFIH	Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ms	Milisegundo
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
PAS	Potencial de ação simples
PAC	Potencial de ação composto
PACc	Potencial de ação composto controle
S	Sul
sp	espécie
spp	espécies
TAB.	Tabela
TLC	Cromatografia de camada fina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VD	Vaso dorsal
W	Oeste
°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

	Página	
1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Ordem Hemiptera	17
1.1.1	Família Reduviidae	18
1.1.2	Família Belostomatidae	20
1.2	A saliva dos heterópteros	21
1.2.1	A saliva dos reduviídeos	23
1.2.2	A saliva dos belostomatídeos	26
1.3	A dor, o sucesso alimentar e percepção do hospedeiro	28
1.4	Atividade da saliva de <i>Triatoma infestans</i> sobre as terminações nervosas	30
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Obtenção e criação dos insetos	37
4.1.1	Criação dos triatomíneos	37
4.1.2	Captura e manutenção dos espécimes de <i>Belostoma anurum</i>	37
4.2	Coleta de saliva	38
4.2.1	Saliva de triatomíneos	38
4.2.2	Saliva de <i>Belostoma anurum</i>	38
4.3	Preparação de nervo isolado de rato (' <i>Single Sucrose-Gap</i> ')	39
4.3.1	Dissecação dos ratos e montagem de câmara da ' <i>single sucrose-gap</i> '	39
4.3.2	Montagem do sistema ' <i>single sucrose gap</i> '	40
4.4	Purificação parcial da saliva de heterópteros com atividade sobre o PAC de nervo isolado de rato (saliva semipurificada)	42
4.4.1	Processo de semipurificação da saliva dos heterópteros	42
4.4.2	Obtenção da saliva semipurificada	43
	a) <i>Panstrongylus megistus</i>	43
	b) <i>Belostoma anurum</i>	43
4.5	Caracterização da natureza química das biomoléculas da saliva de	43

	heterópteros com atividade sobre o PAC de nervo isolado de rato	
4.5.1	Ensaio de natureza lipídica	43
4.5.2	Ensaio de natureza protéica	45
	a) Obtenção da saliva semipurificada de <i>Belostoma anurum</i>	45
	b) Proteinase K à concentração de 0,009 µg/µl	45
	c) Proteinase K à concentração de 0,018 µg/µl	46
	d) Teste-controle para atividade da Proteinase K	46
4.6	Cromatografia de Camada Fina (TLC) da saliva semipurificada de <i>T. infestans</i> e <i>B. anurum</i>	47
4.6.1	Obtenção da saliva semipurificada	47
	a) <i>Triatoma infestans</i>	47
	b) <i>Belostoma anurum</i>	47
4.6.2	Cromatografia de Camada Fina (TLC)	48
4.7	Teste das frações (manchas) obtidas no TLC da saliva semipurificada de <i>T. infestans</i> e <i>B. anurum</i> sobre o nervo ciático isolado de rato	48
4.8	Preparação do vaso dorsal isolado de <i>Rhodnius Prolixus</i>	50
4.8.1	Obtenção do Vaso Dorsal (VD) de <i>Rhodnius prolixus</i>	51
4.8.2	Ensaio da saliva dos heterópteros sobre a preparação do VD de <i>Rhodnius prolixus</i>	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Atividade da saliva dos heterópteros sobre o PAC de nervo isolado de rato	53
5.1.1	Saliva de <i>Triatoma infestans</i>	54
5.1.2	Saliva de <i>Panstrongylus megistus</i>	54
5.1.3	Saliva de <i>Belostoma anurum</i>	54
5.1.4	Experimentos controle	55
5.2	Atividade da saliva semipurificada dos heterópteros sobre o PAC de nervo isolado de rato	58
5.2.1	Saliva semipurificada de <i>Panstrongylus megistus</i>	58
5.2.2	Saliva semipurificada de <i>Belostoma anurum</i>	58
5.3	Ensaio para determinar se o princípio ativo responsável pela ação sobre o PAC de nervo isolado de rato era de natureza lipídica	61
5.3.1	Saliva de <i>Triatoma infestans</i>	61

5.3.2	Experimentos controle	61
5.3.3	Saliva de <i>Belostoma anurum</i>	62
5.4	Ensaio para determinar se o princípio ativo responsável pela ação sobre o PAC de nervo isolado de rato era de natureza protéica	63
5.5	Cromatografia de camada fina (TLC) da saliva de semipurificada dos heterópteros	67
5.6	Atividade sobre o PAC, da saliva semipurificada e separada por TLC sobre o PAC	67
5.6.1	Experimento controle com β -mercaptoetanol	67
5.6.2	Saliva semipurificada de <i>Triatoma infestans</i>	68
5.6.3	Saliva semipurificada de <i>Belostoma anurum</i>	69
5.7	Estabilidade da preparação de vaso dorsal isolado de <i>Rhodnius prolixus</i>	72
5.7.1	Saliva de <i>Triatoma infestans</i>	72
5.7.2	Saliva de <i>Panstrongylus megistus</i>	72
5.7.3	Saliva de <i>Belostoma anurum</i>	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORDEM HEMIPTERA

A ordem Hemiptera, com cerca de 82.000 espécies descritas, é considerada a mais abundante em número e com maior diversidade entre os insetos com metamorfose incompleta. Usualmente, esta ordem era dividida em duas subordens, Heteroptera e Homoptera, de acordo com a estrutura das asas e posição do aparelho bucal. A subordem Heteroptera continua mantida, entretanto, há uma tendência em dividir o antigo agrupamento Homoptera em três principais subordens: Coleorrhyncha, Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha (SCHOFIELD, 1995).

A grande maioria dos hemípteros é fitofágicos, que, juntamente com as espécies predadoras e o reduzido número de espécies hematófagas constituem a subordem Heteroptera. As famílias Cimicidae, Polycetenidae, Reduviidae (apenas a subfamília Triatominae), e Lygaeidae (apenas a espécie de *Clerada apicicornis*) constituem os representantes hematófagos da subordem Heteroptera (SCHOFIELD, 1995).

Dentro da subordem Heteroptera, a hematofagia parece ter surgido independentemente, em diferentes momentos, a partir de ancestrais predadores. Schofield (1995) propõe que a evolução para a hematofagia surgiu a partir de espécies predadoras generalistas, que se alimentavam de pequenos invertebrados presentes em ninhos de aves ou de mamíferos. Ocasionalmente, algumas dessas espécies de predadores passaram a se alimentar do sangue de aves e mamíferos, desenvolvendo com isso a hematofagia oportunista. Das espécies que se mantiveram intimamente associadas aos ninhos de aves e mamíferos, algumas delas passaram a se alimentar mais freqüentemente do sangue desses vertebrados, adaptando-se progressivamente para a hematofagia facultativa, e que posteriormente evoluiu para a hematofagia obrigatória. Durante essa mudança de dieta alimentar, ocorreram várias

adaptações morfológicas, incluindo modificação das peças bucais dos insetos; mudanças na sua fisiologia, como perdas e/ou ganho de enzimas (salivares ou intestinais), necessárias para o aproveitamento e a digestão dos nutrientes presentes nessa nova dieta alimentar (o sangue).

A FIG. 1 apresenta um esquema dessa rota hipotética de evolução para a hematofagia.

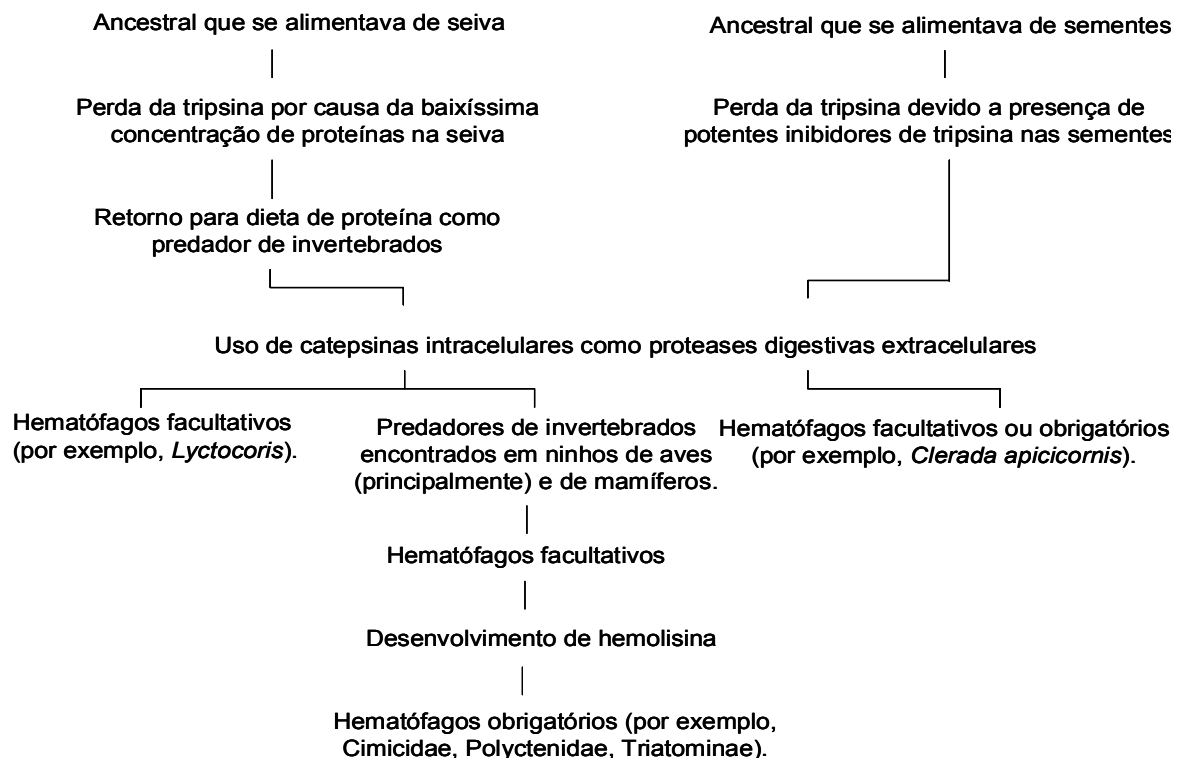


FIGURA 1 – Esquema da rota hipotética de evolução para a hematofagia na subordem Heteroptera.

Fonte: SCHOFIELD, 1995, p. 50.

1.1.1 Família Reduviidae

Nos heterópteros terrestres encontramos o hábito predador nas duas infraordens: Pentatomorpha e Cimicomorpha, sendo que na última estão incluídas também a família Reduviidae e as famílias de hábito hematofágico Cimicidae e Polyctenidae. Há aproximadamente 6230 espécies de reduviídeos, distribuídos em 912 gêneros, sendo que

apenas cerca de 138 espécies da subfamília Triatominae apresentam o hábito hematofágico (COSTA & FELIX, 2007; GALVÃO et al., 2003).

A provável linha de evolução dos triatomíneos vem há muito tempo sendo pesquisada, existindo ainda importantes questões sistemáticas e filogenéticas que permanecem sem respostas. Uma das teorias filogenéticas propõe uma origem monofilética para o grupo, pressupondo que os triatomíneos provêm de um único ancestral predador (HYPSA et al., 2002; LENT & WYGODZINSKY, 1979; PEREZ et al., 1992); enquanto que outra teoria, polifilética, acredita que os triatomíneos teriam se originado de diferentes linhagens de reduviídeos predadores que convergiram para hábito hematofágico, em diferentes períodos evolutivos (DE PAULA, et al., 2005; SCHAEFER, 2003; SCHOFIELD, 1988).

A subfamília Triatominae é constituída por seis tribos, que incluem 18 gêneros. Duas tribos contêm as espécies de maior importância médica: Rhodniini, com dois gêneros: *Rhodnius* Stål, 1859 (16 spp.), *Psammolestes* Bergroth, 1911 (3 spp.); e Triatomini, com nove gêneros: *Triatoma* Laporte, 1832 (68 spp.), *Paratriatoma* Barber, 1938 (1sp.), *Panstrongylus* Berg, 1879 (13 spp.), *Eratyrus* Stål, 1859 (2 spp.), *Mepraia* Mazza et al., 1940 (2 spp.), *Meccus* Stål, 1859 (6 spp.); *Nesotriatoma* Usinger, 1944 (3 spp.); *Hermanlenticia* Jurberg & Galvão, 1997 (1 sp.) e *Dipetalogaster* Usinger, 1939 (1 sp.). As outras quatro tribos (Alberprosenini, Cavernicolini, Linshcosteiini e Bolboderini) não apresentam espécies de importância médica, na transmissão do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, para indivíduos humanos (FERERO et al., 2004; GALVÃO et al., 2003).

Segundo Schofield (1994) aproximadamente metade das espécies de triatomíneos já foram encontradas naturalmente infectadas pelo *T. cruzi*. As demais espécies, embora não tenham sido observadas no meio natural portando o *T. cruzi*, infectam-se facilmente sob condições experimentais.

1.1.2 Família Belostomatidae

A família Belostomatidae compreende insetos aquáticos, da infraordem Nepomorpha, subordem Heteroptera, que geralmente são encontrados associados a plantas aquáticas, em diferentes ambientes de água doce (lóticos e lénticos), tendo ou não peixes. Os insetos são conhecidos em várias regiões do Brasil como “barata d’água”, e todos são predadores. As presas são capturadas de diferentes modos por esses insetos, e através da injeção de sua saliva na presa, ocorre a pré-digestão externa da mesma no meio aquático. O conteúdo semidigerido e liquefeito do corpo desta presa constitui o alimento para estes insetos (NIESER & ALKINS-KOO, 1991; TORRE-BUENO, 1906).

A família Belostomatidae apresenta três subfamílias com oito gêneros: Lethocerinae com o gênero *Lethocerus* Mayr, 1853; Horvathiniinae com o gênero *Horvathinia* Montandon, 1911; e Belostomatinae com seis gêneros: *Weberiella* De Carlo, 1966, *Limnogeton* Mayr, 1853, *Hydrocyrius* Spinola, 1850, *Diplonychus* Laporte, 1833, *Belostoma* Latreille, 1807 e *Abedus* Stål, 1862. No Brasil, são encontrados os gêneros: *Lethocerus*, *Horvathinia*, *Weberiella* e *Belostoma* (PEREIRA, 1992; RIBEIRO, 2005).

Os insetos do gênero *Belostoma* são predadores aquáticos de pequenos invertebrados e vertebrados. Além disso, os insetos deste gênero destacam-se por possuírem um ciclo biológico rápido, com alta fecundidade. Algumas espécies são resistentes a ambientes poluídos com matéria orgânica. Estudos envolvendo a capacidade predatória de diferentes espécies de *Belostoma* sobre moluscos e outros invertebrados (CULLEN, 1969; GARCIA-AVILA et al., 1996; PEREIRA, 1992; PEREIRA et al., 1993; PONTIER & DELPLANQUE, 1976; SEVERIN & SEVERIN, 1911; TORRE-BUENO, 1906) demonstram que esses insetos podem atuar como importantes biorreguladores de vetores de agentes etiológicos de doenças

como a esquistossomose, a filariose, a dengue e a febre amarela (que possuem caramujos ou mosquitos como vetores).

Belostoma anurum, uma espécie de médio porte (em média apresentando 3,4 cm de comprimento), é de fácil manutenção e criação em condições de laboratório (PEREIRA, 1992). É comum a ocorrência desses belostomatídeos em vários ambientes aquáticos de Minas Gerais, inclusive na represa da Pampulha, um reservatório artificial localizado em Belo Horizonte (NIESER & MELO, 1997).

1.2 A SALIVA DOS HETERÓPTEROS

Além da sua função primitiva de lubrificar as peças bucais, a saliva dos heterópteros auxilia no processo de alimentação e digestão, variando sua composição dependendo do hábito alimentar do inseto (MILES, 1972).

Dentro do grupo dos heterópteros fitófagos há uma grande variação no processo digestivo. Em geral, as glândulas salivares dos heterópteros que se alimentam de floema (“sugadores de seiva”) secretam as enzimas amilase e distintas carboidrases; enquanto que as enzimas proteinases e esterases são secretadas pelas glândulas salivares de heterópteros fitófagos que se alimentam de sementes (MILES, 1972).

Cohen (1990, 1996) demonstrou a presença de proteinases e fosfolipases no extrato de glândulas salivares em todas as espécies de heterópteros predadores estudadas (TAB. 1). A presença dessas enzimas na saliva de predadores está relacionada à atividade de pré-digestão do tecido da presa.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a onivoria (hábito predador e fitófago) é bastante difundida entre os heterópteros (COHEN, 1996; COLL & GUERSHON, 2002; MILES, 1972), fato esse que explicaria a presença, na glândula salivar, de pectinases,

amilases ou glicosidases (enzimas típicas de insetos fitófagos) junto com “tripsinas-like” e/ou quimiotripsinas (enzimas típicas de insetos predadores) em alguns grupos (BOYD, 2003; BOYD et al., 2002).

TABELA 1

Secreções salivares presentes em diferentes espécies de heterópteros

	Veneno	Proteinase	Enzima Tripsina-like	Fosfolipase	Triaciglicerol Lipase	Amilase	Pectinase
<i>Lygus hesperus</i>	+	+	/	+	/	+++	+
<i>Deraeocoris</i> sp.	+	+	/	+	/	/	/
<i>Nabis alternatus</i>	++	++	/	+	/	0	/
<i>Sinea confusa</i>	+++	+++	+++	++	/	0	/
<i>Zelus renardii</i>	+++	+++	+++	+++	+	+	0
<i>Podisus maculiventris</i>	+	+	+	/	/	/	/
<i>Geocoris punctipes</i>	+	+	+	+	+	++	0

Legenda: + (presença de atividade); 0 (ausência de atividade); / (atividade não estudada).

Fonte: COHEN, 1996, p. 9.

É interessante ressaltar que algumas espécies de triatomíneos (heterópteros hematófagos) podem alimentar-se da hemolinfa de outros artrópodes, e completar, com esse tipo de alimentação (hemolinfagia), o seu desenvolvimento até o estágio adulto (LOROSA et al., 2000). Um dos primeiros relatos de hemolinfagia em triatomíneos foi feito por Brumpt (1914), ao descrever que algumas ninfas das colônias de triatomíneos, das espécies *Triatoma infestans*, *T. chagasi*, *T. sordida*, *Mestor megista* e *Rhodnius prolixus*, que estavam em jejum (ninfas não alimentadas), frequentemente alimentavam-se de outras ninfas engurgitadas (ninfas alimentadas), fenômeno este, que foi chamado de “canibalismo” pelo referido autor.

Posteriormente, Ryckman (1951) descreveu o mesmo comportamento para ninfas das espécies *T. pallidipennis*, *T. guasayana* e *T. longipes*; assim como Sandoval e colaboradores (2000) para ninfas da espécie *Belminus herreri*. Abalos & Wygodzinsky (1951) descreveram que *T. rubrovaria* poderia usar a hemolinfa de diferentes artrópodes (como por exemplo, hemolinfa de larvas de borboletas e/ou de aranhas) como fonte alimentar. Miles e colaboradores (1981) observaram que ninfas de 1º, 2º e 3º estádios do triatomíneo *Eratyrus mucronatus*, alimentam-se preferencialmente da hemolinfa de outros artrópodes, como por exemplo, de aranhas, enquanto que os demais estádios ninfais e os espécimes adultos alimentam-se de sangue de vertebrados. Estudos de laboratório com as espécies *T. circummaculata*, *T. rubrovaria*, e *T. carcavalloi*, sugerem que o comportamento de hemolinfagia também seja comum nestas espécies (LOROSA et al., 2000, RUAS-NETO et al., 2001). Pouco se conhece sobre a importância da hemolinfagia nos triatomíneos em condições naturais. Um estudo recente destaca que *Belminus herreri*, um triatomíneo que habita regiões de floresta entre a Colômbia e o Panamá, e normalmente está associado a lagartos, poderia colonizar construções humanas e no intradomicílio, as ninfas dessa espécie, teriam preferência por se alimentar de hemolinfa de baratas a sangue de hospedeiros vertebrados (SANDOVAL et al., 2004).

Esse comportamento de hemolinfagia também reforça a hipótese de origem polifilética dos triatomíneos, sugerindo que a hematofagia é uma característica recente nos triatomíneos e que as adaptações para este hábito alimentar ainda estão ocorrendo (SCHOFIELD, 1988, 1995).

1.2.1 A saliva dos Reduviídeos

Poucos estudos foram realizados sobre a saliva de reduviídeos predadores. Edwards

(1961), à procura de uma substância com atividade inseticida, descreveu ‘*in situ*’ a ação da saliva de *Platyeris rhadamanthus* (Hemiptera: Reduviidae) sobre o gânglio abdominal e o vaso dorsal de *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae). A saliva de *P. rhadamanthus* causou um aumento da atividade elétrica das fibras do axônio de *P. americana*, 10 a 15 segundos após a sua aplicação na preparação de gânglio abdominal. Na preparação de vaso dorsal de *P. americana*, a saliva de *P. rhadamanthus* provocou, após 30 segundos a três minutos, contração imediata da musculatura, com parada cardíaca em sístole, acompanhada de contratura geral da musculatura dorsal. O autor sugere que a toxicidade da saliva se deve à lise geral conseqüente da atividade fosfolipásica durante a digestão externa da presa. A TAB. 2 resume os resultados obtidos pelo referido autor, sobre a preparação de coração de *P. americana*, comparando a ação do homogenato de glândulas salivares de outras espécies de hemípteros de distintos hábitos alimentares, realizadas nesse estudo.

TABELA 2

Atividade do homogenato de glândula salivar de diferentes Hemiptera sobre a atividade cardíaca de *Periplaneta americana*

Hemíptero	Quantidade aplicada	Ação
I – Predadores <i>Naucoris cimicoides</i> <i>Platyeris rhadamanthus</i> <i>Rhincoris carmelita</i> <i>Reduvius personatus</i>	0,01 parte de uma glândula em 0,1 ml de salina	Parada imediata em sístole e contratura da musculatura dorsal.
II – Fitófagos <i>Pentatoma rufipes</i>	1 par de glândulas em 0,05 ml da salina	Aumento discreto da frequência cardíaca, parada após alguns minutos.
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	1 par de glândulas em 0,05 ml de salina	Redução lenta da amplitude das contrações cardíacas.
III – Hematófagos <i>Rhodnius prolixus</i> <i>Triatoma protracta</i>	1 par de glândulas em 0,1 ml de salina	Ausência de efeitos cardíacos.

Fonte: EDWARDS, 1961, p. 64.

A saliva de triatomíneos, assim como a de outros insetos hematófagos, auxilia na tarefa da alimentação, pois os danos mecânicos decorrentes da movimentação das peças bucais dos triatomíneos sobre a pele do hospedeiro, durante a obtenção do repasto sangüíneo, desencadeiam uma série de respostas fisiológicas de reparo: (1) hemostasia (liberação de componentes hemostáticos que evitam a perda de sangue do hospedeiro, através dos mecanismos de agregação plaquetária, coagulação sangüínea e/ou vaso constrição); (2) a inflamação (liberação de componentes algésicos, tais como, as prostaglandinas, a histamina e/ou a serotonina, que alertam o hospedeiro sobre a presença de um estímulo doloroso, facilitando com isso a eliminação desse estímulo mecanicamente); e (3) a resposta imune (liberação de componentes que recrutam ao sítio da picada células do sistema imunológico do hospedeiro, aptas para montarem uma resposta imune adequada ao estímulo invasor, como por exemplo, as interleucinas, a histamina, os mastócitos, os macrófagos e a resposta humoral) (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003). Para contrapor a essas reações adversas do hospedeiro, o que permitiria uma rápida e eficiente alimentação, os triatomíneos liberam saliva durante todo o seu processo alimentar. (SOARES et al., 2006).

Uma grande variedade de atividades biológicas tem sido detectada na saliva dos triatomíneos, incluindo anticoagulantes (HELLMAN & HAWKINS, 1964; 1965; PEREIRA et al., 1996; RIBEIRO et al., 1995), vasodilatadores (RIBEIRO & NUSSENZVEIG, 1993; RIBEIRO et al., 1990, 1993), molécula responsável por atividade anestésica (DAN et al., 1999), molécula formadora de poro (AMINO et al., 2002), agente inibidor do complemento (CAVALCANTE et al., 2003), inibidores de agregação plaquetária induzida por colágeno (NOESKE-JUNGLUT et al., 1994; RIBEIRO & GARCIA, 1981), ADP (RIBEIRO & GARCIA, 1980; SARKIS et al., 1986; SMITH et al., 1979), ácido araquidônico (RIBEIRO & SARKIS, 1982) trombina (FRANCISCHETTI et al., 2000; NOESKE-JUNGLUT et al., 1995), serotonina, epinefrina e norepinefrina (ANDERSEN et al., 2003).

Vale a pena ressaltar que algumas destas atividades podem indiretamente diminuir a irritação do hospedeiro induzida pela picada do inseto, tais como: (1) atividade anti-histamínica (RIBEIRO & WALKER, 1994), que dificulta a ligação da histamina com as terminações nervosas livres, evitando o aparecimento do prurido; (2) atividade da enzima sialidase (AMINO et al., 1998) que atenua a reação inflamatória por diminuir o recrutamento de leucócitos para o sítio da picada; (3) atividade imunossupressora (KALVACHOVÁ et al., 1999), que dificulta a exacerbação da resposta inflamatória induzida pela resposta imune; (4) atividade anti-complemento (CAVALCANTE et al., 2003), que diminui a produção de anafilotoxina; (5) atividade “anestésica-like”, que atua diretamente sobre as fibras nervosas interferindo na geração do impulso nervoso pela inibição da corrente de sódio (Dan et al., 1999).

1.2.2 A saliva dos Belostomatídeos

Um dos primeiros autores que relataram o efeito da saliva de belostomatídeos foi Torre Bueno (1906). Neste estudo, o referido autor observou que a saliva de *Belostoma flumineum* possuía uma ação paralisante sobre as suas presas.

Picado (1936) estudou a ação da saliva de *Lethocerus delpontei*, que apresentou atividade proteolítica, mas não digeriu gelatina timolada (que é digerida por venenos de serpentes). Essa secreção salivar produziu hemorragia seguida de necrose nos tecidos animais em que foi inoculada. Quando diluída em água de aquário (homogenato de 1 par de glândulas/400 ml) produziu paralisia reversível em certos peixes. A injeção intraperitoneal em rã do homogenato de ¼ de glândula salivar intratorácica, juntamente com o rostro de *L. delpontei*, produziu apnéia de curta duração e dificuldade para saltar. A necropsia revelou ausência de hemorragia e leve congestão hepática e renal. O soro anticrotálico, efetivo contra

o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi o único que exerceu atividade neutralizante sobre o veneno desse belostomatídeo. O veneno de *L. delpontei* foi destruído por enzimas de tecidos animais, especialmente as localizadas na pele, que o inativou rapidamente. Esta propriedade neutralizante do veneno também esteve presente nas enzimas de certos tecidos vegetais, como células de batata, que destruíram a sua atividade tóxica.

Rees & Offord (1969) observaram uma rápida liquefação dos tecidos da presa, pela ação da saliva de *Lethocerus cordofanus*, sugerindo a presença de uma potente mistura de enzimas hidrolíticas. Os autores detectaram a atividade de cinco diferentes enzimas proteolíticas (hialuronidase, nuclease, fosfatase e esterase) no macerado de glândula salivar desse belostomatídeo.

De Carlo e colaboradores (1973), utilizando métodos histoquímicos, observaram a presença de lipídios no lóbulo posteroventral da glândula salivar de *Lethocerus mazzai*, também chamado de lóbulo lipócrino por Fauré-Fremiet (1910).

Swart e colaboradores (2006) encontraram diferenças na composição de enzimas salivares dos belostomatídeos *Lethocerus uhleri* (subfamília Lethocerinae) e de *Belostoma lutarium* (subfamília Belostomatinae). Na saliva de *L. uhleri* foram encontradas três enzimas proteolíticas e nenhuma atividade de amilase, enquanto que a saliva de *B. lutarium* apresentou duas enzimas proteolíticas e atividade de amilase. Essa diferença na composição enzimática das salivas foi atribuída às diferentes dietas alimentares realizadas por essas subfamílias.

A saliva das espécies do gênero *Belostoma* é esbranquiçada, viscosa e pouco solúvel em água, sugerindo a presença de lipídeos e lipoproteínas. A presença de proteases conjugadas com lipídeos poderia dificultar a diluição dessas enzimas na água, o que poderia auxiliar a pré-digestão externa da presa no ambiente aquático (PEREIRA, 1992).

Em estudos realizados por Pereira e colaboradores (1988, 1989) com a saliva de *B. anurum*, demonstrou-se que a inoculação intravenosa da saliva de três espécimes desse

belostomatídeo é capaz de matar um camundongo (*Mus musculus*) de cerca de 20 g, 15 a 20 segundos após sua inoculação, e que a saliva de *Belostoma harrisi* (posteriormente identificada como *B. anurum*) induz arritmias cardíacas, hipotensão arterial e morte em 57% dos hamsters anestesiados. Dan e colaboradores (1993) mostraram que saliva de *B. harrisi* produz parada cardíaca em coração isolado de cobaia, podendo ser seguida de contratura (sístole).

1.3 A DOR, O SUCESSO ALIMENTAR E PERCEPÇÃO DO HOSPEDEIRO

A dor, um dos cinco sinais cardinais da inflamação (PEREIRA & BOGLIOLO, 2000), é a resposta fisiológica a estímulos nocivos, responsável por ativar receptores sensoriais, que por sua vez ativam as fibras nervosas sensoriais (fibras nervosas aferentes), e essas são responsáveis por conduzir o estímulo doloroso ao sistema nervoso central. A dor rápida é conduzida por fibras nervosas aferentes do tipo A δ . Ela tem início e fim rápidos e é precisamente localizada. A dor lenta é conduzida por fibras nervosas aferentes do tipo C. É acompanhada por sentimento de mal-estar e por sensação de queimação ou pulsante, e é mal localizada (COSTANZO, 1999).

Os nociceptores pertencem a uma classe de receptores sensoriais, localizados na pele, e respondem a estímulos nocivos dos tipos mecânicos, térmicos e químicos. Eles podem ser inervados por fibras nervosas aferentes do tipo A δ (que são pouco mielinizadas e de condução rápida do estímulo nocivo); ou por fibras nervosas aferentes do tipo C (que são fibras não-mielinizadas e de condução lenta do estímulo nocivo) (MEBLINGER, 1997).

Além da ativação das fibras nervosas aferentes, os nociceptores liberam neuropeptídeos que aumentam a permeabilidade vascular, como por exemplo, a substância P. Quando a substância P é liberada na pele, ela pode produzir vasodilatação, aumento da

permeabilidade capilar, seguidas por vermelhidão, calor e tumefação – três sinais característicos da inflamação (COSTANZO, 1999).

A dor gerada pela picada dos insetos hematófagos é resultante do dano mecânico causado pela movimentação das peças bucais do inseto sobre a pele do hospedeiro e pela ação de componentes salivares desse inseto (RIBEIRO, 1995).

Assim, a percepção do hospedeiro, durante a picada de insetos hematófagos, é um fator determinante para o sucesso da aquisição de sangue pelo inseto, pois, ao sentir dor, o hospedeiro vertebrado pode tentar eliminar o estímulo nocivo mecanicamente. De fato, tem sido demonstrado, em triatomíneos, que a percepção do hospedeiro vertebrado à picada depende da quantidade de insetos aos quais ele é exposto. Assim, um aumento na densidade populacional de triatomíneos induz uma maior percepção das picadas sofridas pelo hospedeiro, o que provavelmente diminui a quantidade média de sangue ingerido pelo inseto, por ocasionar interrupções mais frequentes em seu repasto sangüíneo (PEREIRA et al., 1995, 2006; SCHOFIELD et al., 1986).

Com isso, a obtenção de sangue pelos triatomíneos é limitada pela irritação causada durante o processo de alimentação, que depende do componente perceptivo de sua picada e da densidade populacional de triatomíneos por hospedeiro. Estes dados coincidem com as observações em voluntários humanos que relatam uma picada quase imperceptível de *T. infestans*, o principal vetor da Doença de Chagas na América do Sul (LAVOPIERRE et al., 1959; SCHOFIELD, 1988).

Uma redução da quantidade média de sangue ingerido pelos triatomíneos pode acarretar em prolongamento do estágio ninfal, redução da fecundidade das fêmeas e aumento da probabilidade de dispersão pelo vôo dos adultos. Esses fatores atuam conjuntamente na regulação da densidade populacional dos triatomíneos, uma vez que o status nutricional da população de triatomíneos depende do número de insetos por hospedeiro (SCHOFIELD,

1980, 1986). Experimentos utilizando as mesmas densidades de insetos por hospedeiro mostram que *T. infestans* é mais eficiente do que *P. megistus* e *R. prolixus* na aquisição de sangue em animais não anestesiados, sugerindo que o primeiro seja menos percebido pelo hospedeiro (PEREIRA et al., 1995, 1998).

1.4 ATIVIDADE DA SALIVA DE *Triatoma infestans* SOBRE AS TERMINAÇÕES NERVOSAS

A saliva de *T. infestans* atua sobre a geração do impulso nervoso. Experimentos utilizando como modelo experimental o nervo ciático de rato por meio do método de ‘*single sucrose gap*’ mostraram que a saliva induziu uma redução progressiva da amplitude do potencial de ação composto (PAC), sem apresentar alterações na duração ou na fase de repolarização. Esta redução mostrou-se irreversível mesmo após 30 minutos de lavagem com solução controle (solução de Locke) (DAN et al., 1999).

Experimentos posteriores de ‘*patch clamp*’ (*whole cell*) em células GH₃, mostraram que a adição da saliva de dois espécimes de *T. infestans* reduziu progressivamente a amplitude da corrente de sódio (I_{Na}) atingindo um bloqueio de 83 ± 13 %. Uma proteína purificada da saliva de *T. infestans*, com massa molecular aproximada de 14 kDa, reproduziu os efeitos da saliva sobre o nervo isolado e sobre os canais de sódio, demonstrando-se pela primeira vez a ação direta da saliva de insetos hematófagos sobre fibras nervosas. (DAN, 2000).

Provavelmente, o fato dos canais de sódio desempenharem uma importante função na condução nervosa, faz deles alvos de diversas toxinas, (por exemplo, tetrodotoxina, saxitoxina, batrachotoxina), como também de fármacos, (por exemplo, os anestésicos locais) e de inseticidas (DDT e piretróides). Alguns destes compostos ligam-se aos canais de sódio especificamente e com alta afinidade, sendo capazes de modificar a fisiologia do canal

através da ocupação de diferentes locais receptores. Até o momento seis diferentes locais de ligação para toxinas foram demonstrados (CATERRALL, 1980, 1988).

Existem 10 versões (isoformas) de canal de sódio que, embora possuam uma estrutura tri-dimensional comum, apresentam variações na seqüência de aminoácidos (WAXMAN, 2006). Recentemente Cox e colaboradores (2006) publicaram um interessante estudo sobre a incapacidade de sentir dor em humanos que apresentavam apenas uma única mutação em uma isoforma de canal de sódio (Nav 1.7), demonstrando com isso a importância desses canais iônicos.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Durante muito tempo especulou-se sobre a existência de um princípio anestésico na saliva de insetos hematófagos (LENT & WYGODZINSKY, 1979; MELLINK & BOVENKAMP, 1981). Entretanto, somente recentemente, foi demonstrado que a saliva de *T. infestans* apresenta uma atividade inibitória sobre a geração do impulso nervoso devido a uma redução da corrente de sódio (DAN et al., 1999). Esta atividade inibitória sobre o PAC de nervo isolado de rato é reproduzida de forma reversível por uma proteína da saliva de *T. infestans* (14 kDa), que já foi purificada e sequenciada (DAN, 2000).

A importância de tal atividade é clara, pois reduz a percepção do inseto pelo hospedeiro durante a hematofagia. A irritação induzida durante o processo de alimentação pode diminuir o sucesso dos insetos hematófagos na obtenção do seu repasto sanguíneo, pois o incômodo estimula o comportamento de defesa do hospedeiro (“grooming”).

Embora a filogenia dos triatomíneos seja controversa, todos concordam com a existência de um predador reduvídeo como ancestral hematófago da subfamília Triatominae (HYPSA et al., 2002; SCHOFIELD, 1988). Tal hipótese é reforçada pela observação do comportamento de hemolinfagia em algumas espécies de triatomíneos (ABALOS & WYGODZINSKY, 1951; BRUMPT, 1914; LOROSA et al., 2000, MILES et al., 1981; RUAS-NETO et al., 2001; SANDOVAL et al., 2000, 2004).

Neste contexto, a caracterização comparativa de algumas atividades biológicas e das biomoléculas presentes na saliva de heterópteros poderá proporcionar uma melhor compreensão sobre as adaptações para a hematofagia a partir de ancestrais predadores. A nossa hipótese de trabalho é de que a atividade paralisante encontrada na saliva de predadores especializados poderia ser um precursor da atividade anestésica presente na saliva de triatomíneos.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a atividade da saliva de duas espécies de triatomíneos, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*, e do predador *Belostoma anurum* sobre o potencial de ação composto de nervo ciático isolado de *Rattus norvegicus* e sobre a preparação de vaso dorsal isolado de *Rhodnius prolixus*, bem como, caracterizar parcialmente o princípio ativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a ação da saliva dos triatomíneos *T. infestans* e *P. megistus* e do predador *B. anurum* sobre o potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático isolado de rato;
- Comparar a ação da saliva dos triatomíneos *T. infestans* e *P. megistus* e do predador *B. anurum* sobre a preparação de vaso dorsal (VD) isolado de *R. prolixus*;
- Comparar a ação da saliva semipurificada de *P. megistus* e do predador *B. anurum* sobre o PAC de nervo ciático isolado de rato;
- Verificar a ação da saliva semipurificada de *B. anurum* sobre a preparação de VD isolado de *R. prolixus*;
- Caracterizar a natureza química (lipídica e/ou protéica) do princípio ativo presente na saliva semipurificada de *T. infestans* e *B. anurum* sobre o PAC de nervo ciático isolado de rato;
- Caracterizar por Cromatografia de Camada Fina (TLC) a saliva semipurificada de *T. infestans* e *B. anurum*;
- Testar a atividade das frações (manchas) obtidas na TLC da saliva semipurificada de *T. infestans* e *B. anurum* sobre o PAC de nervo ciático isolado de rato.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CRIAÇÃO DOS INSETOS

4.1.1 Criação dos triatomíneos

Utilizou-se exemplares de duas espécies de triatomíneos (*T. infestans* e *P. megistus*) que foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Instituto de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ).

Os triatomíneos foram criados e mantidos no insetário climatizado (com temperatura de 28 ± 1 °C, umidade relativa do ar de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas) do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em frascos de acrílico com diâmetro de base de 15 cm e altura de 19 cm, tampados com tecido de algodão. Os frascos foram forrados com papel de filtro e no seu interior foi colocada uma tira de cartolina dobrada em sanfona. Esta cartolina, além de servir de ponte entre o triatomíneo e a fonte alimentar, aumenta o espaço interno disponível para o inseto.

Os insetos eram alimentados semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*) ou ratos (*R. norvegicus*).

4.1.2 Captura e manutenção dos espécimes de *Belostoma anurum*

Para coleta de exemplares da espécie *B. anurum*, foram utilizadas conchas metálicas de fundo chato, perfurado, com cerca de 30 cm de diâmetro (panelas de aço). As conchas foram adaptadas a cabos de madeira, e são rotineiramente utilizadas para captura de planorbídeos, hospedeiros de *Schistosoma mansoni*. As coletas foram realizadas na represa da

Pampulha (19°50'-19°52' S e 43°58'-44°0' W), um reservatório artificial, localizado na região Norte do Município de Belo Horizonte, próximo ao campus da UFMG.

Os espécimes adultos de *B. anurum* provenientes da represa da Pampulha, foram transferidos, individualmente, para pequenos recipientes plásticos, de volume aproximado de 200 ml e 15 cm de altura (copos plásticos), contendo água de torneira desclorada e, um pedaço de isopor para o repouso do inseto. *Biomphalaria glabrata* fornecidos pelo Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, e ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* criados e mantidos no LFIH, serviram de alimento para os belostomatídeos.

4.2 COLETA DE SALIVA

4.2.1 Saliva de triatomíneos

Os triatomíneos (*T. infestans* e *P. megistus*) foram imobilizados individualmente, entre os dedos médio, anular e polegar de uma das mãos do coletor, e com o auxílio dos dedos da outra mão, realizou-se estimulação mecânica em todo o corpo do inseto. A saliva liberada pela probóscida de cada triatomíneo foi coletada em um tubo capilar de vidro, transferida para um tubo de microcentrífuga (mantido em banho de gelo durante a coleta), e, posteriormente, armazenada no freezer a - 20 °C até seu uso.

4.2.2 Saliva de *Belostoma anurum*

A coleta da saliva de *B. anurum* foi feita através da estimulação elétrica (3 Hz, 100 V e 2 ms de duração) na inserção do primeiro par de patas do inseto (PEREIRA, 1992). A saliva liberada pela probóscida de cada belostomatídeo foi coletada em um tubo de capilar de vidro, e transferida para um tubo de microcentrífuga (mantido em banho de gelo durante a coleta)

contendo 10 µl de água ultrapura (Mille Q) ou 10 µl solução de Locke (composição: NaCl 154,0 mM, KCl 5,5 mM, CaCl₂ 2,2 mM, HEPES 5,0 mM e Glicose 5,0 mM e pH 7,45 ajustado com NaOH), e posteriormente, foi armazenada em freezer a -20 °C até o seu uso.

4.3 PREPARAÇÃO DE NERVO ISOLADO DE RATO ('*SINGLE SUCROSE-GAP*')

4.3.1 Dissecção dos ratos e montagem da câmara de registros eletrofisiológicos

Nos experimentos de nervo ciático isolado de rato, foram utilizados espécimes de *R. norvegicus*, pesando entre 250 e 350 g. Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de exsanguinação. Após fixação em decúbito ventral, os nervos ciáticos direito e esquerdo, foram cuidadosamente dissecados e removidos. Os nervos foram mantidos em solução de Locke até a remoção da bainha conjuntiva, permanecendo viáveis por até 24 horas.

A dissecção da bainha conjuntiva do nervo foi realizada em um microscópio estereoscópico (SZ – 40, Olympus, Japão), e, após sua remoção, o tronco nervoso foi cuidadosamente colocado sobre os cinco compartimentos da câmara experimental (câmara de registros eletrofisiológicos) (FIG. 2). Foi aplicada uma fina camada de vaselina sobre as divisões entre os compartimentos da câmara para assegurar o posicionamento do nervo. Além disso, a vaselina desempenha um importante papel de auxiliar no isolamento elétrico dos compartimentos.

Os eletrodos dos compartimentos 1 e 2 (FIG. 2) servem para aplicar a estimulação elétrica no nervo, a uma frequência inferior a 0,1 Hz. Os eletrodos dos compartimentos 3 e 5 (FIG. 2) captam a resposta do nervo ao estímulo aplicado. Pelo compartimento 4 (FIG. 2) flui continuamente uma solução de sacarose isotônica (283 mM). A saliva dos heterópteros (bruta, semipurificada ou fracionada por TLC) diluída em solução de Locke foi adicionada ao compartimento central (compartimento teste), que possui um volume reduzido (40 µl), e é isolado eletricamente do quinto compartimento (de registro) através do fluxo constante da

solução de sacarose (~ 3 a 4 ml/min). Os demais compartimentos foram preenchidos com solução de Locke e possuem um volume de 200 μ l cada.

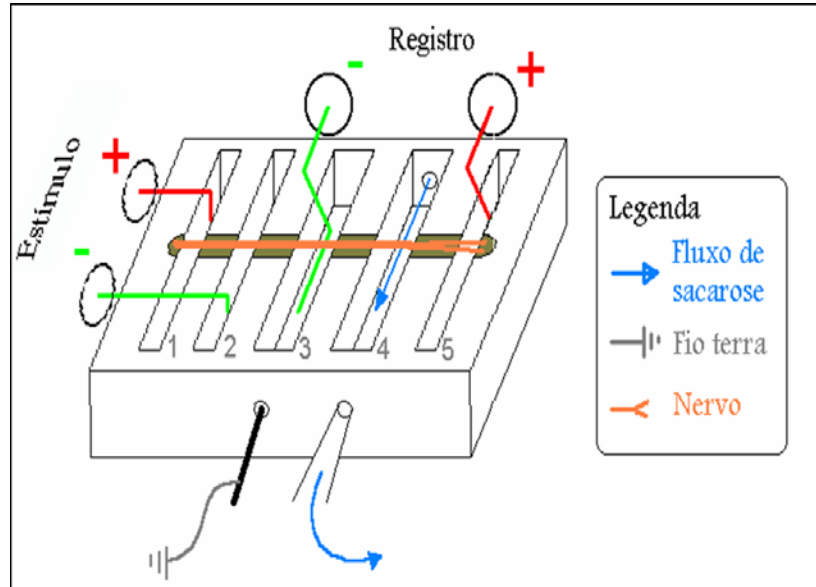


FIGURA 2 – Câmara de registros eletrofisiológicos. A câmara foi projetada pelo Dr. Jader dos Santos Cruz, do Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG.

As câmaras utilizadas nos experimentos foram confeccionadas com resina Epoxi a partir de um molde de silicone, permanecendo por pelo menos 1 ano na estufa, a aproximadamente 40 °C, para secar completamente.

4.3.2 Montagem do sistema ‘single sucrose gap’

Os experimentos utilizando o método ‘single sucrose gap’ foram realizados de acordo com o método descrito por Cruz e colaboradores (1994). A câmara de registros eletrofisiológicos foi ligada ao sistema de estimulação e de registro (FIG. 3) para a obtenção dos registros do potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático isolado de rato. O PAC ou um potencial de ação simples (PAS) correspondem à resposta elétrica da(s) fibra(s) aos

estímulos elétricos (pulsos) que são aplicados e que se propagam ao longo dessas fibras (KUTCHAI, 2000).

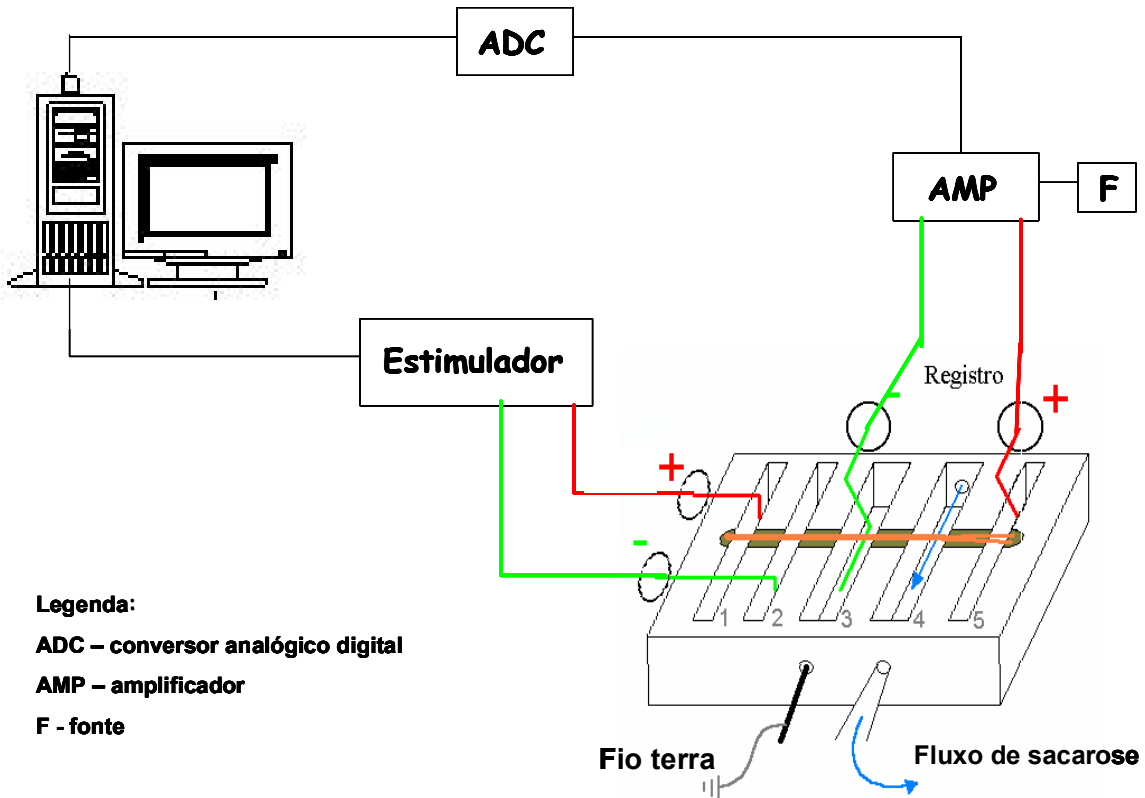


FIGURA 3 – Sistema de estimulação e de registro do método de ‘single sucrose-gap’

Os dois primeiros compartimentos da câmara foram utilizados para estimulação do nervo, com pulsos de voltagem isolados (geralmente entre 2 a 3 voltz) com duração de 60 μ s, gerados por um estimulador de pulsos. Os pulsos estimulam o nervo através de eletrodos de níquel-cromo nos compartimentos 1 e 2. A resposta elétrica do nervo (o PAC) é captada pelos dois eletrodos de registro adaptados nos compartimentos 3 e 5. Esses eletrodos foram acoplados a um amplificador diferencial de ganho fixo, alimentado por uma fonte de ± 12 V. Assim, o PAC captado foi amplificado e registrado em um osciloscópio digital de 36 bits (ADC-100, PICO Technologies) acoplado a um computador. Os registros adquiridos foram gravados em CD para posterior análise (FIG. 3). O principal parâmetro eletrofisiológico

utilizado para análise foi a amplitude dada em mV e definida como a diferença de potencial entre a linha de base e a altura máxima da curva do PAC.

Para que os PACs pudessem ser registrados adequadamente foi necessário o isolamento elétrico, proporcionado pela passagem constante de um fluxo de sacarose pelo compartimento de isolamento, que fica entre os poços de captação do sinal.

Foi requerido um período de aproximadamente 50 minutos para que a preparação entrasse em equilíbrio e se mantivesse estável. Após esse período de estabilização, foram registrados os potenciais de ação controle (PACc), que se mantinham estáveis por mais de 4 horas.

4.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA SALIVA DE HETERÓPTEROS COM ATIVIDADE SOBRE O PAC DE NERVO ISOLADO DE RATO (SALIVA SEMIPURIFICADA)

4.4.1 Processo de semipurificação da saliva dos heterópteros

A saliva dos heterópteros, após ser diluída em solução de Locke ou em água Mille Q, foi submetida ao seguinte procedimento:

- a) Fervura por 2 minutos;
- b) Centrifugação, a 20.900 g, durante 20 minutos, a temperatura ambiente;
- c) O sobrenadante da solução foi transferido para um filtro de membrana (Ultrafree®-MC Microcentrifuge/Milipore, USA), com limite de exclusão da membrana era de 5 kDa , e após a ultrafiltração por meio de centrifugação à 4.900 g, durante 20 minutos, a temperatura ambiente, obteve-se a saliva semipurificada, que corresponde ao material que ficou abaixo do filtro.

4.4.2 Obtenção da saliva semipurificada

a) *Panstrongylus megistus*

A saliva de *P. megistus* foi coletada conforme descrita no item 4.2.1, imediatamente diluída em solução de Locke, na proporção de 1 µl de saliva para 7 µl de solução de Locke, e semipurificada (conforme item 4.4.1). Para a preparação de nervo isolado de rato, foram aplicados 40 µl desta saliva semipurificada.

b) *Belostoma anurum*

A saliva de *B. anurum*, que havia sido retirada em solução de Locke (conforme item 4.2.2), foi diluída na proporção de 1 belostomatídeo para 50 µl de solução de Locke e semipurificada (conforme item 4.4.1), sendo que 40 µl desta saliva semipurificada foram utilizados na preparação de nervo isolado de rato.

Durante as etapas: **a** (fervura por 2 minutos da solução contendo saliva + solução de Locke) e **b** (centrifugação dessa solução a 20.900 g, durante 20 minutos) do processo de semipurificação da saliva de *B. anurum* foi obtido, além do sobrenadante, um anel lipídico, que era descartado.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA NATUREZA QUÍMICA DAS BIOMOLÉCULAS DA SALIVA DE HETERÓPTEROS COM ATIVIDADE SOBRE O PAC DE NERVO ISOLADO DE RATO

4.5.1 Ensaio de natureza lipídica

Alíquotas de 20 µl de saliva de *T. infestans* ou de *B. anurum* ou de água Mille Q foram

submetidas a extração de lipídeos, de acordo com o seguinte procedimento:

- Adicionar a saliva ou a água a uma solução de extração composta por 200 µl de água destilada, 250 µl de clorofórmio e 500 µl de metanol;
- A solução contendo saliva + solução de extração (ou água + solução de extração) foi homogeneizada, a cada cinco minutos, durante 60 minutos, utilizando o vórtex (MS 1 Minishacker, Ika®);
- Posteriormente realizou-se uma centrifugação por 30 minutos a 1000 g, da mistura, a temperatura ambiente;
- Em seguida, a fase líquida foi separada do precipitado formado e adicionada a uma mistura contendo 800 µl de clorofórmio e 800 µl de água destilada;
- Esta nova solução foi homogeneizada por 30 segundos em vórtex e após centrifugação de 30 minutos a 1000 g, a temperatura ambiente, separou-se as duas fases formadas, a fase aquosa (superior, não lipídica) da fase orgânica (inferior, lipídica);
- As amostras de cada fase (aquosa e orgânica) foram secas em uma centrífuga de evaporação.

Para os ensaios de nervo ciático de rato, o material retido na fase aquosa foi ressuspense em 42 µl de solução de Locke; enquanto que o material retido na fase orgânica foi ressuspense em 42 µl de solução de Locke, acrescida do solvente apolar dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 5 %.

A utilização de DMSO a 5% em solução de Locke foi realizada para aumentar a possibilidade de solubilizar todos os compostos orgânicos que pudessem estar à parede do tubo de microcentrífuga, e que não se solubilizariam em solução de Locke (solução polar).

Nos ensaios de nervo isolado de rato foram realizados três experimentos controle, utilizando-se somente DMSO a 5 % em solução de Locke.

4.5.2 Ensaio de natureza protéica

a) Obtenção da saliva semipurificada de *Belostoma anurum*

A saliva de *B. anurum* foi retirada (conforme item 4.2.2) em água Mille Q e diluída na proporção de 1 belostomatídeo para 10 µl de água e semipurificada (conforme o item 4.4.1). Após o processo de semipurificação, obteve-se 400 µl de saliva semipurificada (em água) totalizando o equivalente à saliva de aproximadamente 40 belostomatídeos). Esta saliva semipurificada foi dividida em duas alíquotas de 200 µl, que foram secas em centrífuga de evaporação e armazenadas no freezer a -20 °C, para posterior utilização nos ensaios de natureza protéica. Para estes ensaios foram utilizadas duas diferentes concentrações de proteinase K: 0,009 µg/µl e 0,018 µg/µl, que serão detalhados a seguir.

b) Proteinase K à concentração de 0,009 µg/µl

Uma das alíquotas contendo saliva semipurificada de *B. anurum* (que havia sido secada na centrífuga de evaporação, conforme descrito no item 4.6.a, foi ressuspensa em 200 µl de solução de Locke, e foram retiradas duas amostras de 70 µl cada (correspondendo à saliva de aproximadamente 7 insetos cada), que foram submetidas ao seguinte tratamento:

- Uma amostra da saliva semipurificada (70 µl) foi tratada com proteinase K (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,009 µg/µl totalizando um volume final de 72 µl;
- A outra amostra de 70 µl foi utilizada como controle positivo da saliva (saliva semipurificada não tratada com proteinase K);
- Como controle positivo da proteinase K, utilizou-se 70 µl de solução de Locke + proteinase K na concentração de 0,009 µg/µl, totalizando um volume final de 72 µl;
- Estas amostras (saliva semipurificada tratada com proteinase K, controle saliva

semipurificada e controle proteinase K) foram mantidas a 37 °C durante 3 horas;

- As duas amostras que continham proteinase K foram transferidas para filtros de membrana, (com limite de exclusão de 5 kDa), e, após a ultrafiltração por centrifugação à 4.900 g, durante 20 minutos, a temperatura ambiente, para separar a proteinase K das amostras, retirou-se 40 µl do material que ficou abaixo do filtro (material filtrado) de cada uma das amostras, que foram utilizados nos ensaios de atividade sobre PAC de nervo isolado de rato.

c) Proteinase K à concentração de 0,018 µg/µl

A segunda alíquota contendo saliva semipurificada de *B.anurum* (descrita no item 4.5.2.a) foi ressuspensa em 200 µl de solução de Locke. Os procedimentos adotados foram os mesmos descritos no item 4.5.2, porém utilizando o dobro de proteinase K (concentração de 0,018 µg/µl) durante os ensaios de atividade sobre PAC de nervo isolado de rato.

d) Teste-controle para atividade da Proteinase K

A proteinase K utilizada nos ensaios descritos anteriormente (ítems b e c) foi submetida a um teste de verificação da sua atividade. Utilizou-se o seguinte protocolo:

- Três tubos de microcentrífugas foram separados e rotulados, sendo que em cada um deles foram adicionados 100 µl de tampão Tris/HCl (0,1 M, pH 7,5).
- No tubo 1 foram adicionadas Proteinase K (concentração final 0,009 µg/µl) e Azocazeína (Merck) (concentração final 1%) em 200 µl de solução salina 0,9%.
- No tubo 2 foram adicionadas Proteinase K (concentração final 0,018 µg/µl) e Azocazeína (concentração final 1 %) em 200 µl de solução salina 0,9%.

- No tubo 3, correspondente ao branco, foi adicionada apenas a Azocazeína (concentração final 1%) em 200 µl de solução salina 0,9%.
- Os tubos foram mantidos a 37 °C, por 3 horas;
- Acrescentou-se em cada tubo 600 µl de ácido tricloroacético (Merck) a 10%, e, após 15 minutos, foram centrifugados à 10.600 g, por 5 minutos, a temperatura ambiente;
- Foram transferidos 600 µl do sobrenadante de cada tubo para um novo tubo contendo 700 µl de NaOH 1 M.

A leitura de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro (UF-1650 PC/Shimadzu) a 440 nm.

4.6 CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC) DA SALIVA SEMIPURIFICADA DE *T. infestans* E DE *B. anurum*

4.6.1 Obtenção da saliva semipurificada

a) *Triatoma infestans*

A saliva semipurificada de *T. infestans*, foi obtida após a diluição da saliva bruta em água Mille Q, na proporção de 1 µl de saliva para 1 µl de água, e semipurificação (conforme item 4.4.1), e utilizada para a realização da TLC.

b) *Belostoma anurum*

A saliva bruta de *B. anurum* foi retirada em água Mille Q, e, após diluição na proporção de 1 belostomatídeo para 5 µl de água, semipurificada (conforme item 4.5.1) e utilizada para a realização da TLC.

4.6.2 Cromatografia de Camada Fina (TLC)

Para realizar a cromatografia de camada fina da saliva semipurificada de *T. infestans* e *B. anurum* (conforme itens 4.6.1 a e b) foram utilizadas placas de vidro de sílica, de 4 cm de largura e 10 cm de comprimento, do tipo gel(Sigma), específicas para TLC.

Após a aplicação gota a gota de 5 µl da saliva semipurificada (de *T. infestans* ou de *B. anurum*), em um ponto fixo (localizado aproximadamente a 2 cm da base inferior) da placa de TLC, esta placa foi colocada na estufa a 40 °C, por 15 minutos, para secagem completa do material aplicado. Posteriormente, a placa foi colocada cuidadosamente em uma cuba cromatográfica de vidro, com tampa, contendo em seu interior a fase móvel (composta por partes iguais de acetona, metanol, etanol, butanol e hexano). Para obtenção desta fase móvel, que apresentou bons resultados para ambas as salivas testadas, foram realizados experimentos de padronização que visaram à combinação de diferentes reagentes e sua proporções. Durante a corrida da fase móvel o sistema de TLC (cuba cromatográfica) ficou fechado para que a atmosfera em seu interior permanecesse saturada pelo vapor dos solventes.

Depois da TLC, a placa foi novamente colocada na estufa, a 40 °C, para completa evaporação dos solventes da fase móvel, e posteriormente foi revelada em vapor de iodo, utilizando uma cuba cromatográfica de vidro, com tampa, contendo em seu interior algumas esferas de iodo (Merk).

4.7 TESTE DAS FRAÇÕES (MANCHAS) OBTIDAS NA CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC) DA SALIVA SEMIPURIFICADA DE *T. infestans* E *B. anurum* SOBRE O NERVO CIÁTICO ISOLADO DE RATO

Para cada ensaio foram utilizadas duas placas de TLC, com dimensões iguais. Em

uma placa foram aplicados 5 μ l de saliva semipurificada de *T. infestans* ou de *B. anurum* (conforme itens 4.5.1 a ou b), enquanto que na outra placa, foram aplicados 40 μ l ou 80 μ l das amostras de saliva semipurificada desses heterópteros. Em ambas as placas a aplicação das amostras foi realizada gota a gota em um ponto fixo, localizado aproximadamente na mesma posição na placa, a uma altura de 2 cm da base inferior da placa.

As placas contendo foram colocadas simultaneamente dentro da cuba cromatográfica (item 4.6.2), sendo que, após a cromatografia, somente a placa que havia recebido 5 μ l de saliva semipurificada foi revelada com vapor de iodo para localização das frações (manchas obtidas).

Os locais correspondentes às manchas obtidas na placa revelada em vapor de iodo, foram raspados da placa principal (placa contendo 40 ou 80 μ l de saliva semipurificada e que não foi revelada com vapor de iodo) sendo cada fração (mancha presente no pó de sílica) colocada separadamente em um tubo de microcentrífuga devidamente identificado. Essas frações foram armazenadas no freezer, a -20 °C para posterior utilização nos ensaios utilizando nervo ciático isolado de rato.

Nos ensaios utilizando nervo ciático isolado de rato, o pó de sílica correspondente a cada fração da saliva semipurificada obtida por TLC, foi ressuspenso em 70 μ l de solução de Locke acrescida de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) na concentração final de 10 mM, sendo 40 μ l desse material aplicados no ensaio de nervo ciático isolado de rato.

O β -mercaptoetanol é um agente anti-oxidante que foi utilizado para preservar as moléculas suscetíveis de sofrerem oxidação durante os procedimentos químicos. A concentração ideal para os ensaios utilizando solução de Locke contendo β -mercaptoetanol, foi padronizada utilizando-se diferentes concentrações de β -mercaptoetanol, chegando-se as seguintes concentrações finais, que foram aplicadas nos ensaios: 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 10 mM e 20 mM.

4.8 PREPARAÇÃO DO VASO DORSAL ISOLADO DE *Rhodnius prolixus*

Rhodnius prolixus, assim como todos os insetos, possui o sistema circulatório aberto. O único vaso sanguíneo, denominado de vaso dorsal (VD), destes insetos é um tubo, localizado na linha mediana, dorsalmente ao trato alimentar e que se estende do tórax ao abdome (FIG. 4) (CHIANG et al., 1990).

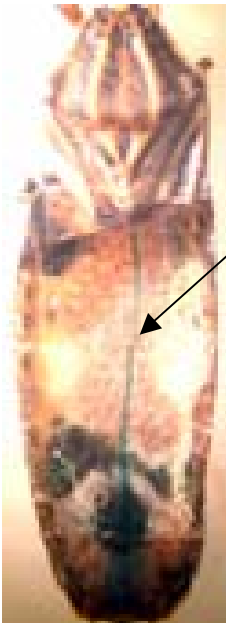
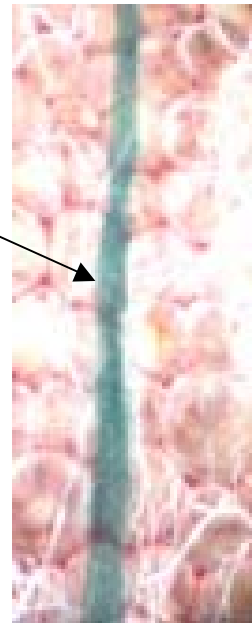
A**B**

FIGURA 4 – Detalhe do vaso dorsal de *R. prolixus* (seta) observado sob microscópio estereoscópio **A**. Aumento de 8 X após a remoção da região dorsal (tergo) do abdômen e **B**. Aumento de 30 X.

A porção posterior do vaso dorsal, o coração, é dividida por válvulas em uma série de câmaras, cada uma das quais contendo um par de aberturas laterais (óstios). A parte anterior do vaso dorsal, a qual não possui óstio, é a aorta dorsal. A hemolinfa circula principalmente pela atividade de contração longitudinal do vaso dorsal, que se inicia da parte posterior para a anterior, a qual se abre na cavidade geral do corpo, a hemocele (CHIANG et al., 1990).

4.8.1 Obtenção do Vaso Dorsal (VD) de *Rhodnius prolixus*

Para obtenção do vaso dorsal (VD) os insetos foram colocados no freezer, a -20 °C, por dois minutos, para imobilizá-los. Posteriormente os insetos foram dissecados e o VD retirado e colocado em uma lâmina escavada contendo 20 µl de solução salina 0,9 % ou 20 µl de solução de Ringer para insetos (NaCl 129,0 mM, KCl 8,6 mM, CaCl₂ 20,0 mM, MgCl₂ 8,5 mM, NaHCO₃ 10,2 mM, NaP₂PO₄ 4,3 mM e Glicose 5,0 mM), com o objetivo de testar a estabilidade da preparação (período de tempo em que era possível observar os batimentos do VD na lâmina escavada). Os batimentos do VD (pulsação) alcançaram maiores estabilidades na presença de solução salina 0,9%, por isso ela foi a solução de escolha para os ensaios utilizando o VD.

4.8.2 Ensaio da saliva dos heterópteros sobre a preparação do VD de *Rhodnius prolixus*

As amostras contendo 0,5 µl, 1 µl ou 2 µl de saliva (bruta ou semipurificada) dos heterópteros foram adicionadas no poço da lâmina escavada contendo o VD de *R. prolixus* em solução salina 0,9% (volume final de 20 µl).

A frequência de contrações (pulsação do VD) foi observada antes e após a adição da saliva dos heterópteros, sob microscópio estereoscópico e os tempos (período em que o VD pulsava) foram registrados com auxílio de um cronômetro.

A lavagem do VD foi realizada com solução salina 0,9% após o ensaio de adição da saliva dos heterópteros.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE DA SALIVA DOS HETERÓPTEROS SOBRE O PAC DE NERVO ISOLADO DE RATO

Através do método de ‘*single sucrose gap*’ foi possível registrar o potencial de ação composto (PAC) gerado pela estimulação elétrica do nervo isolado. Um registro típico de PAC de nervo de rato está ilustrado na figura 5. Pode-se observar que o traçado apresenta duas fases distintas: uma fase ascendente rápida, que corresponde à despolarização do nervo, decorrente da abertura dos canais de sódio; seguida por uma fase descendente, mais lenta, que corresponde à inativação dos canais de sódio e abertura dos canais de potássio, característicos dos processos de repolarização da fibra (nervosa ou muscular).

Os PACs apresentaram amplitudes que variaram entre 30 mV a 60 mV, dependendo, principalmente, do grau de sucesso do isolamento elétrico entre os compartimentos 3 e 5 da câmara experimental (FIG. 2).

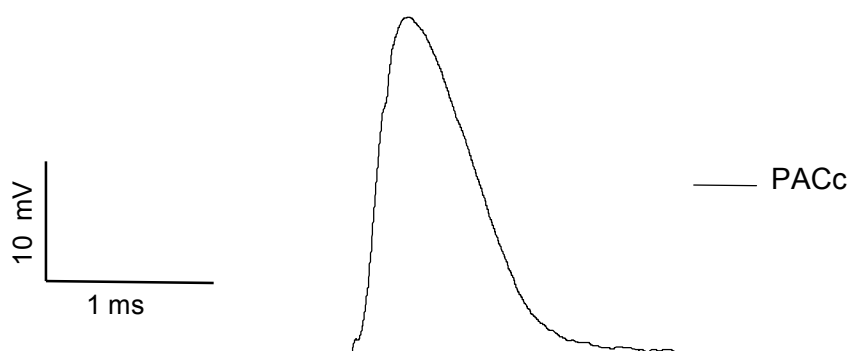


FIGURA 5 – Registro típico do PAC controle (PACc) do nervo ciático isolado de rato. O traçado foi obtido através da aplicação de um estímulo de 2 V com 60 μ s de duração, após 50 minutos da preparação.

5.1.1 Saliva de *Triatoma infestans*

A adição de 0,5 µl de saliva de *T. infestans* (diluída em 39,5 µl de solução de Locke) na preparação de nervo isolado de rato, causou uma redução progressiva da amplitude, sem apresentar alterações na fase de repolarização ou duração do PAC, quando comparada ao registro do PAC controle (PACc). A figura 6A ilustra uma das três réplicas deste experimento. Essa inibição progressiva não apresentou recuperação mesmo 30 minutos após a substituição da solução contendo saliva por solução controle (solução de Locke). A redução média observada foi de $65,0\% \pm 11,1$, (n=3) (FIG.7).

5.1.2 Saliva de *Panstrongylus megistus*

A adição de 5 µl de saliva de *P. megistus* (diluída em 35 µl de solução de Locke) na preparação de nervo isolado de rato, causou uma redução progressiva da amplitude, sem apresentar alterações na fase de repolarização ou duração do PAC, quando comparada ao PACc. A figura 6B ilustra uma das seis réplicas desse experimento. A redução média observada foi de $57,0\% \pm 4,6$ (n=6) (FIG. 7). Essa inibição progressiva apresentou recuperação parcial e gradual da amplitude do PAC, e, 30 minutos após a substituição da solução contendo saliva por solução de Locke (momento da lavagem), a média de recuperação parcial foi de $41,0\% \pm 3,4$ (FIG.7).

5.1.3 Saliva de *Belostoma anurum*

Quando a saliva obtida de um belostomatídeo (~1 µl de saliva) foi misturada em 40 µl de solução de Locke e adicionada à preparação de nervo ciático de rato, ocorreu uma redução

de forma gradual da amplitude do PAC, com alteração na fase de repolarização e aumento da duração, quando comparada ao PACc. A figura 6C ilustra uma das três réplicas desse experimento. Essa inibição progressiva não apresentou recuperação mesmo 30 minutos após lavagem. A redução média observada foi de $49,0\% \pm 12,0$ ($n=3$) em relação ao valor do PACc (FIG.7).

5.1.4 Experimentos controle

Para demonstrar que a redução da amplitude do PAC era devida à ação da saliva dos heterópteros estudados, e não por uma provável diluição da concentração de sódio, foi realizado um controle onde água ultrapura (Mille Q) foi adicionada no lugar da saliva. Ao aplicar 5 μ l de água Mille Q (diluída em 35 μ l de solução de Locke) na preparação de nervo isolado de rato, foi observada uma redução média da amplitude do PAC de $6,4\% \pm 2,5$ ($n=4$) ao longo dos 50 minutos de experimento. A recuperação média foi de $4,0\% \pm 1,0$ em relação ao valor do PACc, após 30 minutos após lavagem (FIG. 7).

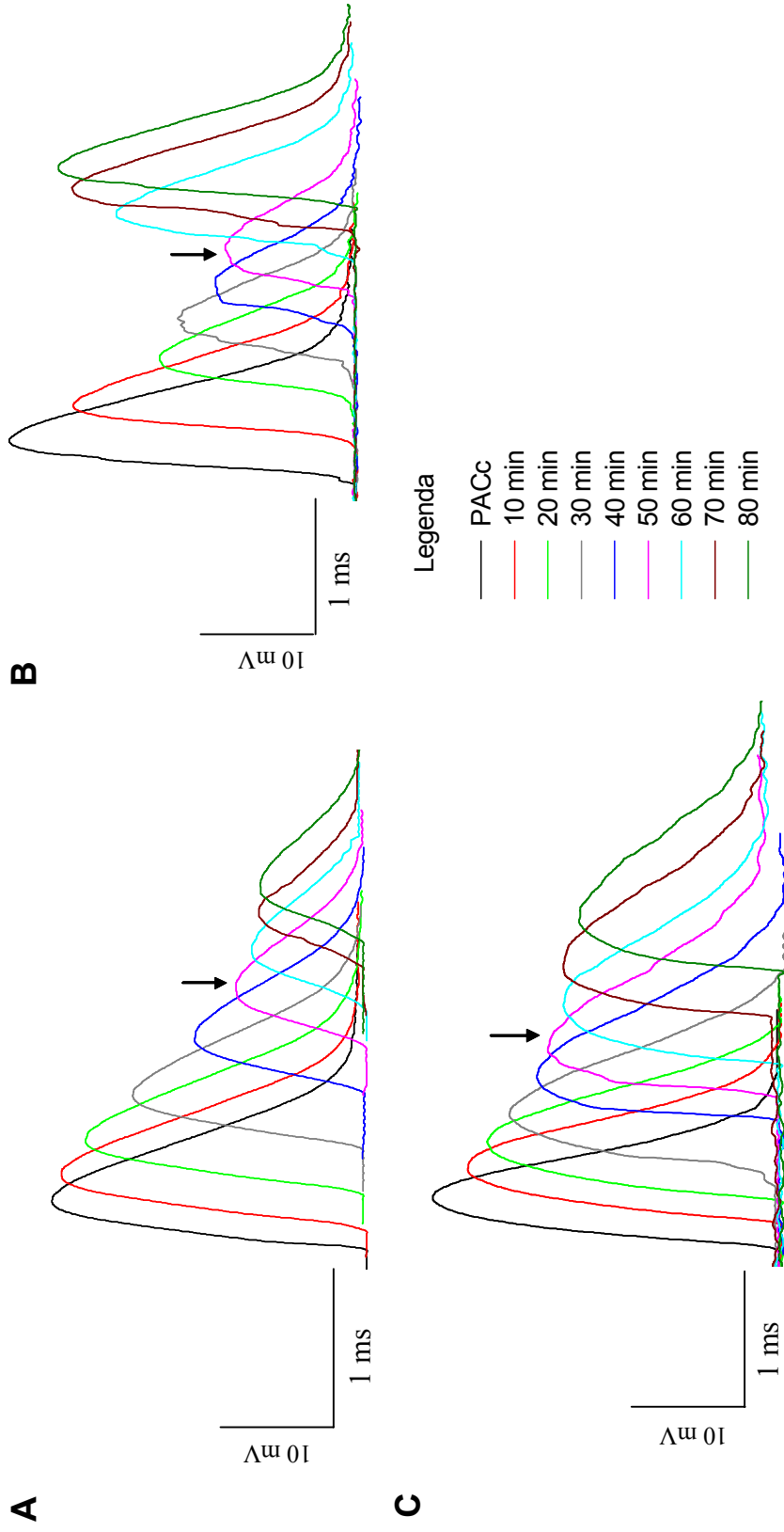


FIGURA 6 – Potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático de rato antes e após a adição da saliva dos heterópteros. Cada curva corresponde a um PAC, registrado em intervalos de 10 minutos, após a adição de saliva ao ensaio, durante 50 minutos. A seta indica o momento da substituição da solução contendo saliva por solução controle (Locke) (instante de lavagem). As três últimas curvas mostram os 30 minutos posteriores à lavagem. **A.** Efeito da adição de 0,5 µl de saliva de *T. infestans* sobre o ensaio. **B.** Efeito adição de 5 µl de saliva de *P. megistus* ao ensaio. Note recuperação parcial da amplitude do PAC após 30 minutos de lavagem. **C.** Efeito da adição da saliva de *B. anurum* (~1 µl de saliva) ao ensaio. Note alteração na fase de repolarização, e aumento da duração do PAC, ao longo dos 50 minutos de teste. Legenda: PACc – Potencial de ação composto controle. Min – minutos. mV – milivolts. ms – milissegundos.

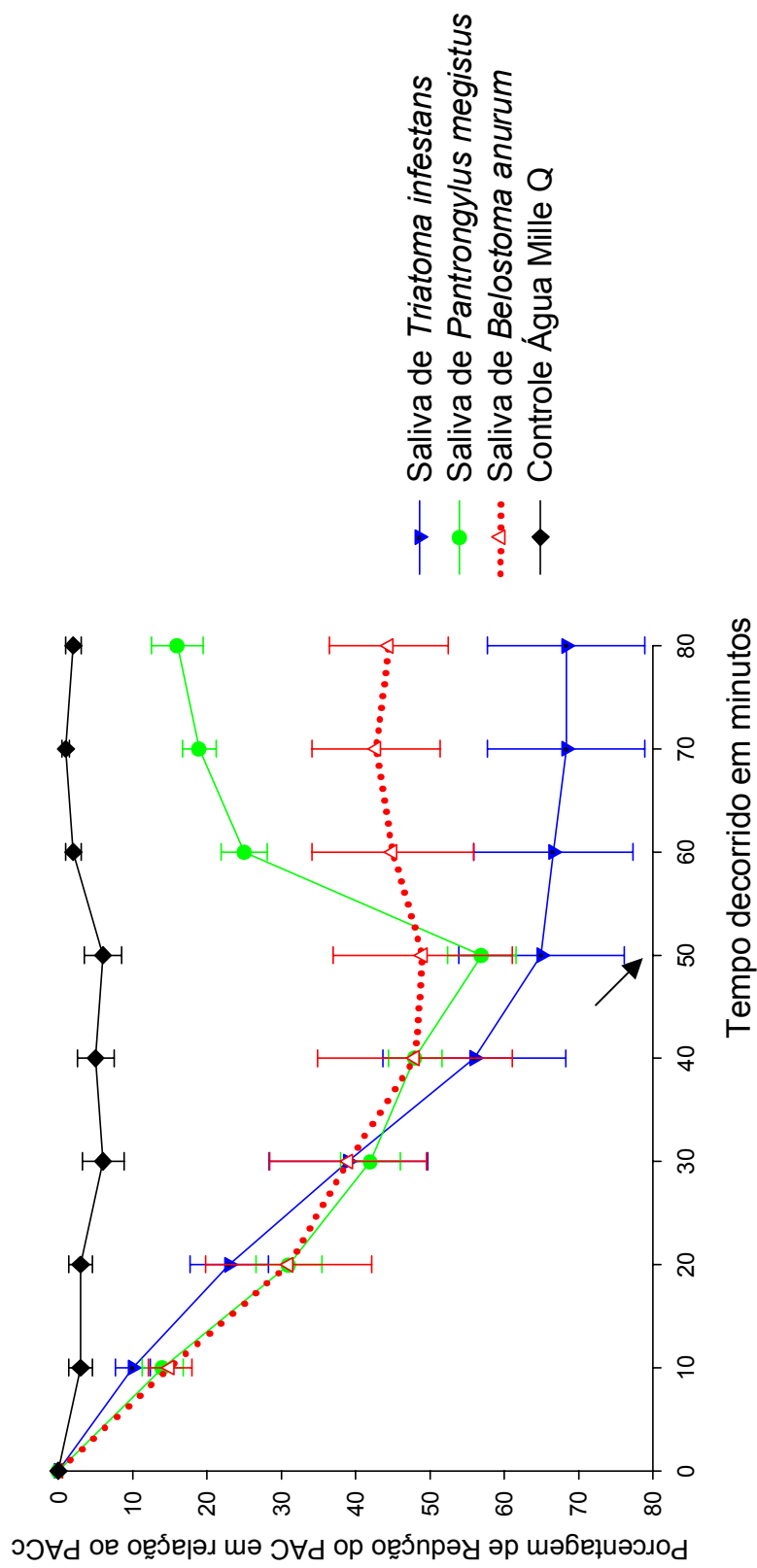


FIGURA 7 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da saliva dos heterópteros: *B. anurum* (saliva de 1 belostomatídeo ~ 1 µl de saliva; n = 3), *T. infestans* (0,5 µl de saliva, n = 3) e *P. megistus* (5 µl de saliva, n = 6), e de Água Mille Q (5 µl, n = 4) sobre o PAC de nervo isolado de rato. Valores referentes à média e ao erro padrão. A seta indica o momento da substituição da solução contendo saliva por solução controle (Locke). Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc - Potencial de ação composto controle.

5.2 ATIVIDADE DA SALIVA SEMIPURIFICADA DOS HETERÓPTEROS SOBRE O PAC DE NERVO ISOLADO DE RATO

5.2.1 Saliva semipurificada de *Panstrongylus megistus*

A adição de 40 µl de saliva semipurificada de *P. megistus* (conforme item 4.5.2 a) na preparação de nervo isolado de rato provocou uma redução, de maneira gradual e reversível, da amplitude do PAC, sem alterar a fase de repolarização. A figura 8A demonstra uma das três réplicas do experimento. A redução da amplitude do PAC, observada foi de 29,0 % ± 8,8 (n=3) após 50 minutos de incubação. Essa inibição apresentou recuperação parcial de 23,0 % ± 6,3 da amplitude do PAC, após 30 minutos de lavagem (FIG.9).

5.2.2 Saliva semipurificada de *Belostoma anurum*

A adição de 40 µl de saliva semipurificada de *B. anurum* (conforme item 4.5.2 a) na preparação de nervo isolado de rato provocou uma redução de maneira gradual e reversível da amplitude do PAC, sem alterar a fase de repolarização. A figura 8B ilustra um desses experimentos. A redução média da amplitude do PAC, observada em cinco experimentos, foi de 32,0 % ± 7,7, após 50 minutos de incubação. Essa inibição progressiva apresentou recuperação parcial e gradual da amplitude do PAC, de 20,0 % ± 1,6 30 minutos após lavagem (FIG.9). Esta recuperação não acontecia quando o nervo era tratado com saliva bruta de *B. anurum*.

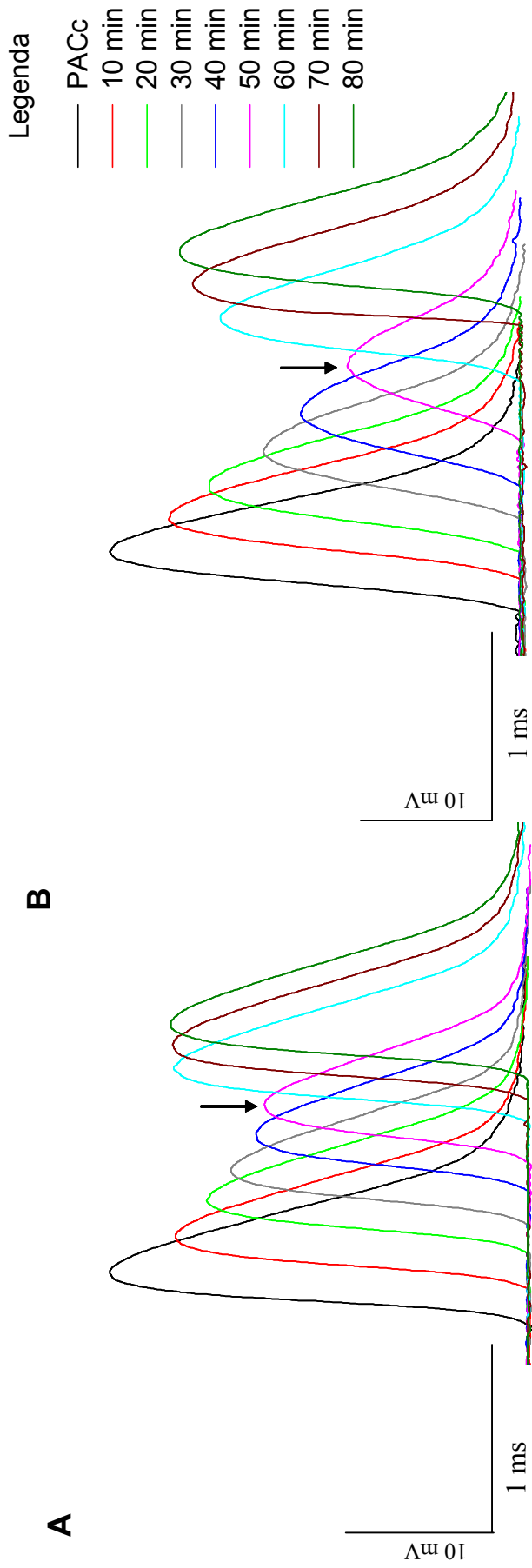


FIGURA 8 – PAC de nervo ciático de rato antes e após a adição da saliva semipurificada de *P. megistus* e *B. anurum*. Cada curva corresponde a um PAC, registrado em intervalos de 10 minutos, após adição da saliva semipurificada ao ensaio, durante 50 minutos. A seta indica o momento da substituição da solução contendo saliva por solução de Locke (lavagem). As três últimas curvas mostram os 30 minutos posteriores à lavagem. **A.** Efeito da adição de saliva semipurificada de *P. megistus* sobre o ensaio. **B.** Efeito da adição de saliva semipurificada de *B. anurum* sobre o ensaio. Note ausência de alteração na fase de repolarização, e de duração do PAC, ao longo dos 50 minutos de teste, e recuperação da amplitude do PAC após troca da solução contendo saliva por solução de Locke (lavagem). Legenda: PAC - Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle. Min – minutos. mV – milivolts. ms – milissegundos

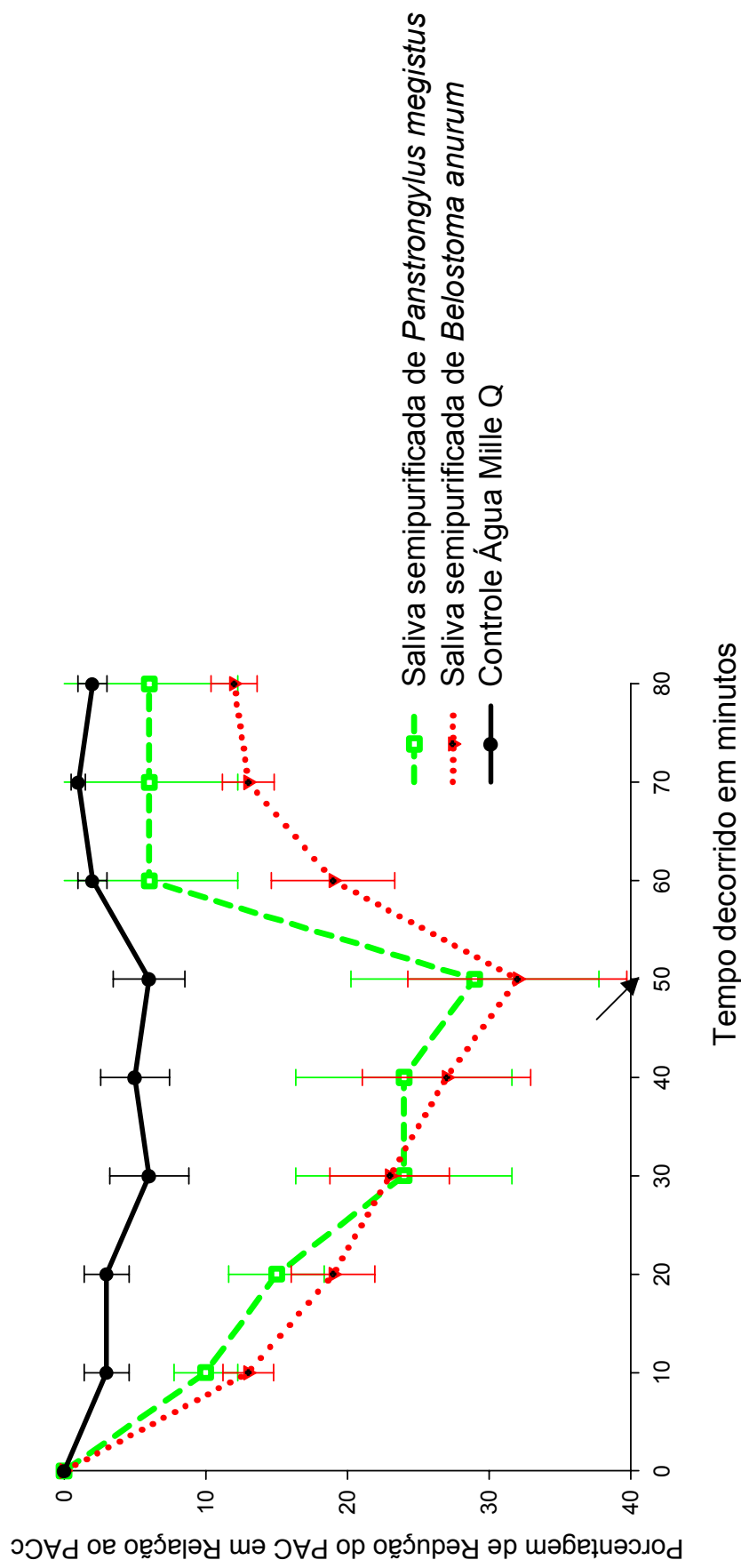


FIGURA 9 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da saliva semipurificada dos heterópteros: *P. megistus* (40 μ l de saliva semipurificada, na proporção de 1 μ l de saliva para 8 μ l de solução de Locke, n = 3) e *B. anurum* (40 μ l de saliva semipurificada, na proporção de 1 belostomatídeo para 50 μ l de solução de Locke; n= 5) e do controle utilizando Água Mille Q (5 μ l, n = 4) sobre o PAC de nervo isolado de rato. Valores referentes à média e ao erro padrão. A seta indica o momento da substituição da solução contendo saliva por solução de Locke. Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle.

5.3 ENSAIO PARA DETERMINAR SE O PRINCÍPIO ATIVO RESPONSÁVEL PELA AÇÃO NO NERVO ISOLADO DE RATO ERA DE NATUREZA LIPÍDICA

5.3.1 Saliva de *Triatoma infestans*

Após a realização do protocolo de extração de lipídeos (conforme item 4.6.1) testaram-se separadamente as duas frações obtidas (fase aquosa e fase orgânica) da saliva de *T. infestans*. A adição de 40 µl do material retido na fase aquosa, na preparação de nervo isolado de rato, reduziu de forma gradual e reversível a amplitude do PAC sem alterar a fase de repolarização. A redução média observada na amplitude do PAC, em dois experimentos realizados, foi de 15,0 % após 50 minutos de incubação. Quinze minutos após a lavagem observou-se uma recuperação total na amplitude do PAC (100,0% de recuperação) (FIG. 10).

A adição de 40 µl do material retido na fase orgânica, durante o ensaio produziu uma redução na amplitude do PAC de 5% e após 30 minutos de lavagem a recuperação parcial foi de 2,0 % (FIG. 10).

5.3.2 Experimentos controle

Para determinar se os reagentes utilizados no protocolo de extração de lipídeos eram responsáveis pela a redução da amplitude do PAC observada no material retido na fase aquosa, foram realizados dois experimentos controle. A adição, no ensaio, de 40 µl dos materiais obtidos na fase aquosa e orgânica produziu, após 50 minutos de ensaio, uma redução média da amplitude do PAC de 4,8% e 5,0%, com recuperação parcial de 2,0 e 1,0%, após 30 minutos de lavagem (FIG 10).

Os experimentos controle utilizando DMSO a 5 % em solução de Locke, quando adicionados na preparação de nervo, não produziram redução na amplitude do PAC, mesmo

após 15 minutos da sua adição (n=3), demonstrando com isso que a adição de DMSO a 5%, não interfere na geração do impulso nervoso.

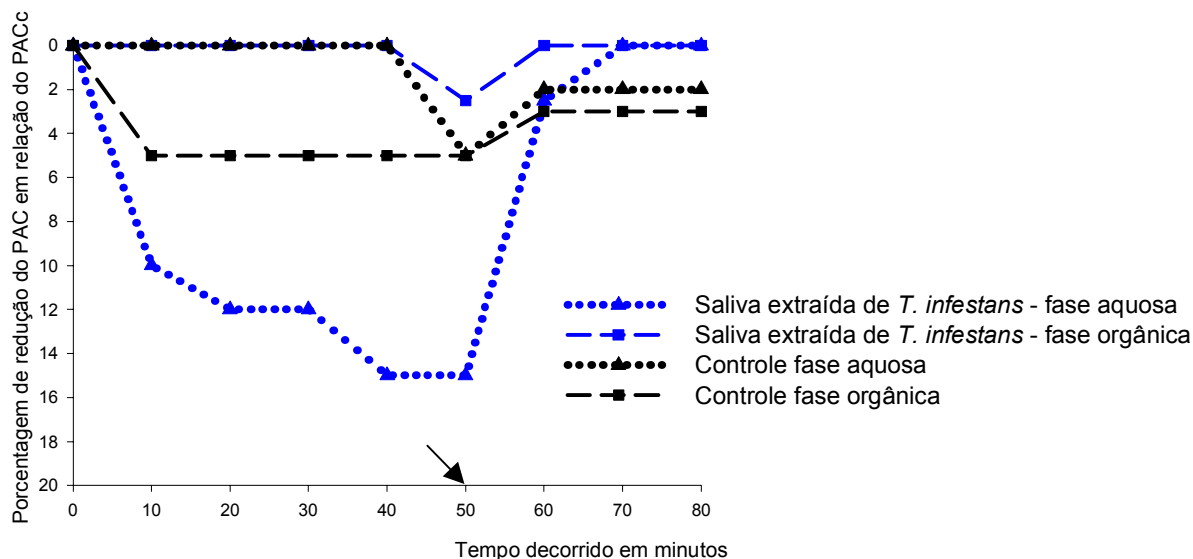


FIGURA 10 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da fase aquosa e orgânica, da saliva extraída de *T. infestans* (n=2) e do experimento controle (n=2). A seta indica o momento em que a solução contendo saliva foi substituída por solução de Locke. Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle.

5.3.3 Saliva de *Belostoma anurum*

Após a realização do protocolo de extração de lipídeos (conforme item 4.6.1) testaram-se separadamente as duas frações obtidas (fase aquosa e fase orgânica) da saliva de *B. anurum* na preparação de nervo isolado de rato. A adição de 40 μ l do material retido na fase aquosa reduziu de forma gradual e reversível a amplitude do PAC sem alterar a fase de repolarização. A redução média da amplitude do PAC, observada em três experimentos realizados, foi de $41,0\% \pm 11,9\%$, após 50 minutos de incubação. Trinta minutos após a substituição da solução contendo saliva, por solução de Locke, observou-se uma recuperação parcial da amplitude do PAC, de $27,0\% \pm 4,6\%$ (FIG.11).

A adição no ensaio de 40 μ l do material retido na fase orgânica causou uma redução

na amplitude de PAC de $7,0\% \pm 1,0$, e após 30 minutos da substituição da solução contendo saliva por solução de Locke, observou-se uma recuperação parcial na amplitude do PAC, de $4\% \pm 2,8$ (FIG. 11).

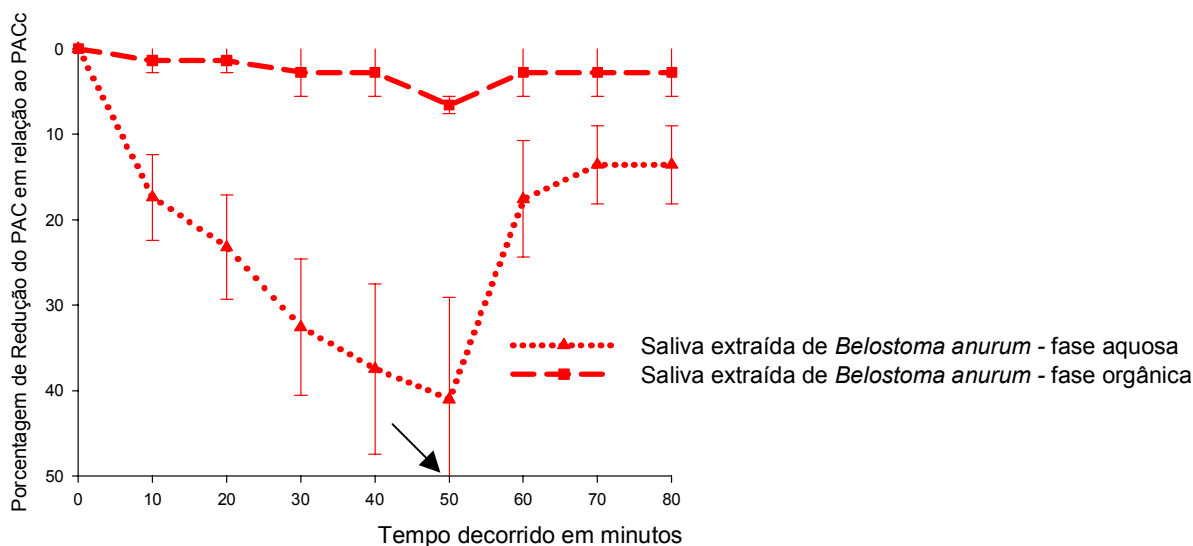


FIGURA 11 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição da fase aquosa e orgânica, da saliva extraída de *B. anurum* (n=3). Valores referentes à média e ao erro padrão. A seta indica o momento em que a solução contendo saliva foi substituída por solução de Locke. Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle.

5.4 ENSAIO PARA DETERMINAR SE O PRINCÍPIO ATIVO RESPONSÁVEL PELA AÇÃO NO NERVO ISOLADO DE RATO ERA DE NATUREZA PROTÉICA

A adição das alíquotas de saliva semipurificada de *B. anurum*, que foram mantidas com duas concentrações diferentes de proteinase K, (conforme item 4.5.2), produziu uma redução gradual e reversível a amplitude do PAC, na preparação de nervo isolado de rato, sem alterar a fase de repolarização. A redução da amplitude do PAC, após 15 minutos de ensaio, foi de 83,0% para a saliva semipurificada de *B. anurum* tratada com proteinase K na concentração de $0,009 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (FIG. 12A) e de 72,0% para a saliva semipurificada que foi tratada com proteinase K na concentração de $0,018 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (FIG.12B). Essa inibição

progressiva apresentou recuperação parcial e gradual da amplitude do PAC de 66,0% e 40,0%, respectivamente, 30 minutos após lavagem (FIG.12A e B).

No ensaio controle com saliva semipurificada *B. anurum*, sem proteinase K (não tratada), a redução da amplitude do PAC após 10 minutos, foi de 100% para a alíquota referente ao ensaio de 0,009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteinase K, e 30 minutos após a lavagem, a recuperação parcial da amplitude do PAC foi de 70% (FIG. 12A), e para a alíquota de saliva semipurificada não tratada com proteinase K, referente ao ensaio de 0,018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (de proteinase K), a redução da amplitude do PAC após 15 minutos, foi de 71%, e, 30 minutos após a lavagem, a recuperação da amplitude do PAC foi de 57% (FIG. 12B).

Foi realizado um terceiro ensaio, com duração total de 80 minutos, com salivas semipurificadas de *B. anurum* tratadas com proteinase K (na concentração de 0,018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e não tratada (controle saliva semipurificada), a adição dessas salivas semipurificadas causou uma redução na amplitude do PAC de 78,0% e de 65%, respectivamente, após 50 minutos de ensaio (FIG. 12C). Trinta minutos após lavagem, observou-se uma recuperação parcial e gradual da amplitude do PAC de 64,0% e 53 %, respectivamente (FIG 12C).

Quando adicionada proteinase K (conforme item 4.6.2), na preparação de nervo, não houve redução na amplitude do PAC, mesmo após 15 minutos da sua adição (n=3), demonstrando, que a proteinase K não interfere na geração do impulso nervoso (FIG.12).

Para o teste de atividade da proteinase K utilizou-se como substrato a azocazeína, a 1%,(conforme item 4.5.2 d), os valores de absorbância obtidos, após 3 horas de incubação a 37 °C, para as amostras contendo as concentrações de 0,009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteinase K e o branco foram de 1,173 nm, 1,459 nm e 0,021 nm, respectivamente (FIG. 13). Demonstrando que a proteinase K, utilizada nos ensaios de caracterização de biomoléculas de natureza protéica, encontrava-se ativa.

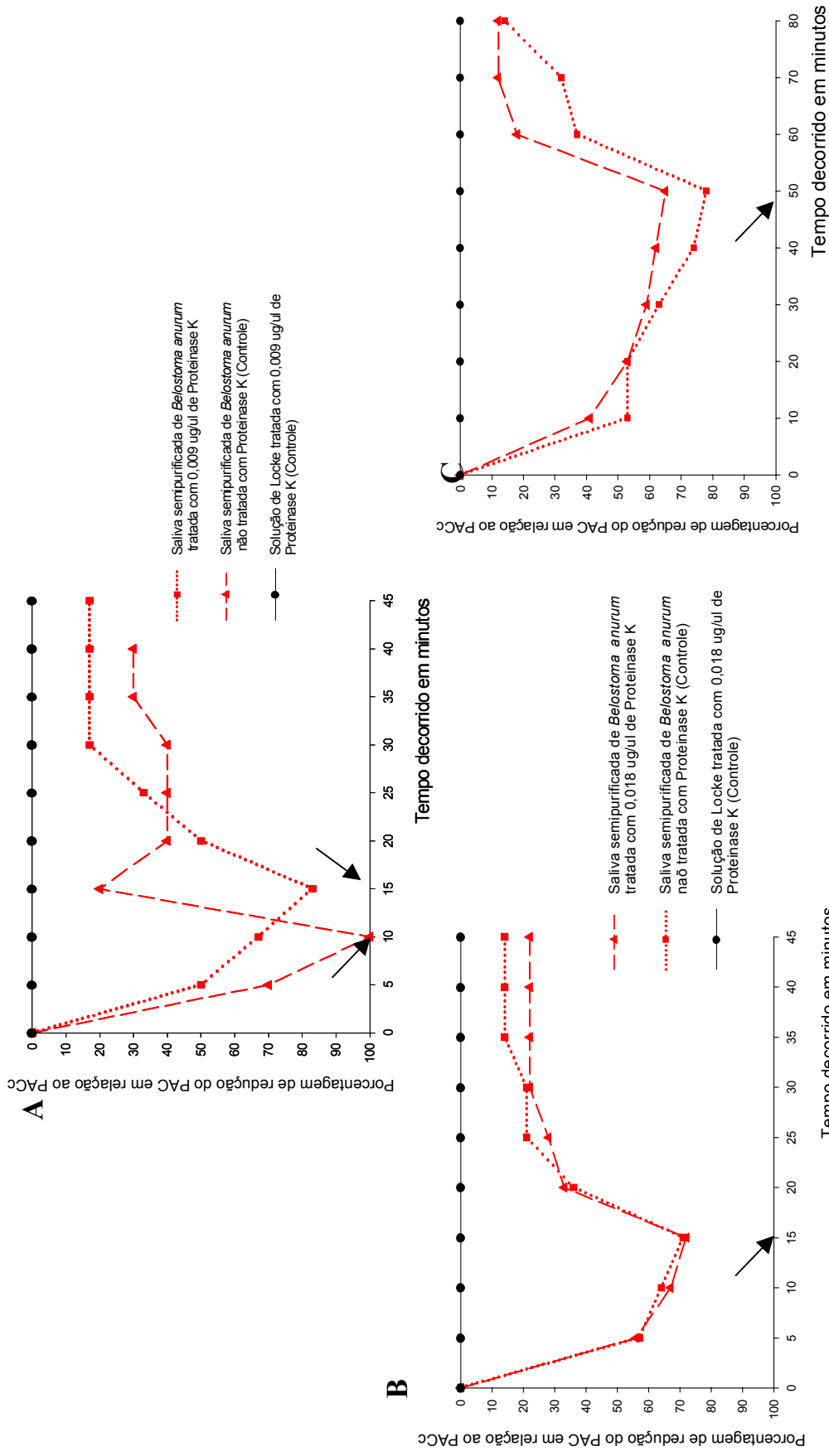


FIGURA 12 – Porcentagem de redução média do PAC observada após a adição das salivas semipurificadas de *B. anurum* tratadas ou não com proteinase K. **A** – Ensaio referente à concentração de 0,009 µg/µl de proteinase K, durante 45 minutos. **B** – Ensaio referente à concentração de 0,018 µg/µl de proteinase K, durante 80 minutos. **C** – Ensaio referente à substituição da solução contendo saliva por solução de Locke. Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle

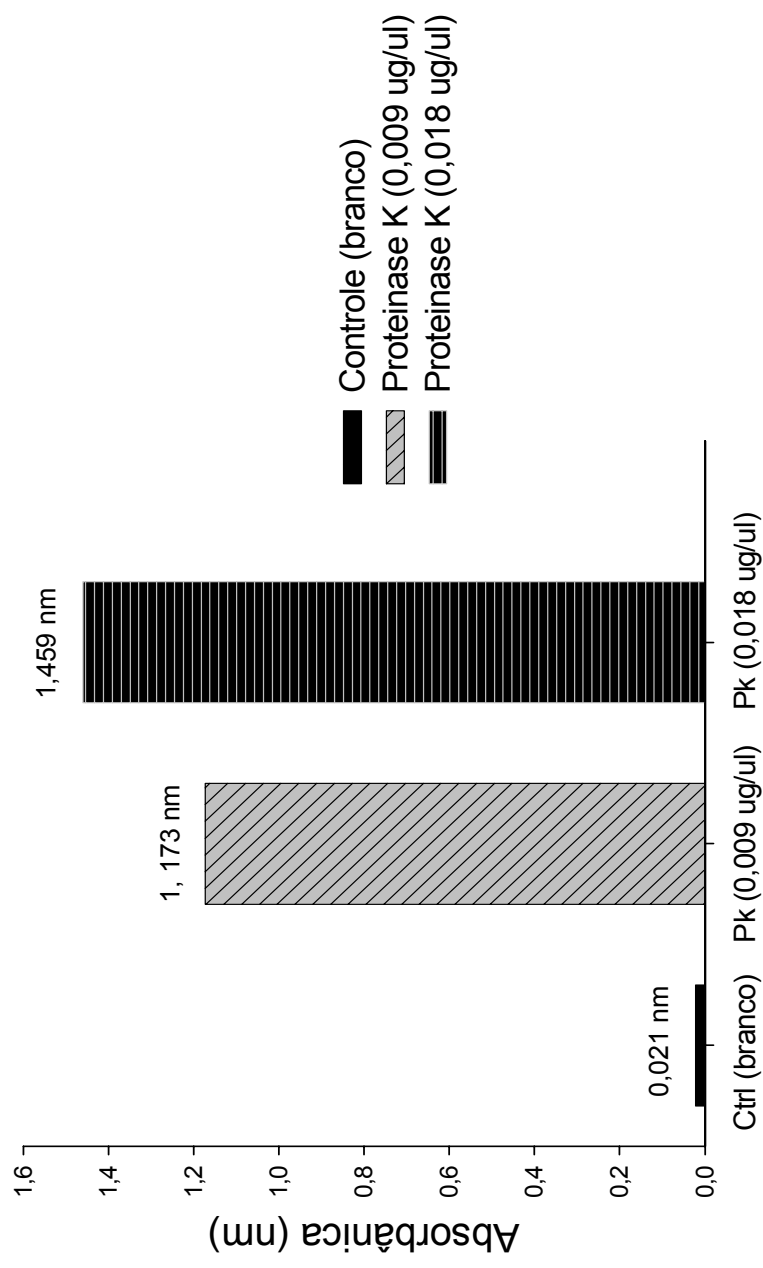


FIGURA 13 – Atividade da enzima proteinase K sobre o substrato de azocazeína. Valores de absorbância das amostras de proteinase K, em duas diferentes concentrações (0,009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e do branco, após 3 horas de incubação a 37 °C.

5.5 CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC) DA SALIVA DE SEMIPURIFICADA DOS HETERÓPTEROS

A aplicação de 5 μ l de saliva semipurificada de *T. infestans* e de *B. anurum* (conforme itens 4.7.1 a) em um sistema de cromatografia de camada fina (TLC), permitiu a visualização de duas manchas (uma na origem e outra em um ponto alto) em cada placa (FIG. 14 A).

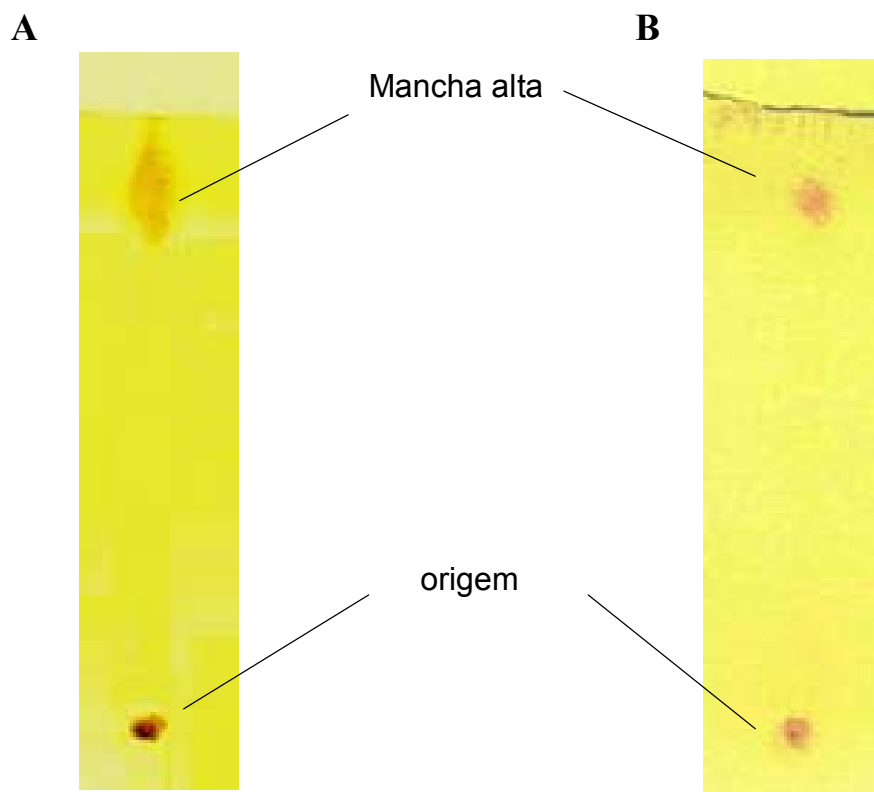


FIGURA 14 – TLC de saliva semipurificada de *Triatoma infestans* (A) e *Belostoma anurum* (B). Foram aplicados 5 μ l de cada saliva semipurificada.

5.6 ATIVIDADE DA SALIVA SEMIPURIFICADA E SEPARADA POR TLC SOBRE O PAC

5.6.1 Experimento controle com β -mercaptoetanol

Nenhuma das cinco concentrações finais de β -mercaptoetanol (0,1 mM, 0,5 mM,

1 mM, 10 mM e 20 mM) em solução de Locke produziu redução da amplitude do PAC, mesmo após 15 minutos da sua adição. Foi realizado um novo ensaio de nervo ciático isolado de rato, porém com duração de 50 minutos, utilizando a concentração final de 10 mM de β -mercaptoetanol (em solução de Locke), e novamente, nenhuma redução da amplitude do PAC foi observada, demonstrando que o β -mercaptoetanol, nas diferentes concentrações testadas, não interfere na geração do impulso nervoso.

5.6.2 Saliva semipurificada de *Triatoma infestans*

As frações da saliva semipurificada de *T. infestans* raspadas da placa de sílica gel, foram ressuspensas em 70 μ l de solução de Locke acrescida de β -mercaptoetanol (na concentração final de 10 mM) e aplicadas na preparação de nervo isolado de rato.

A aplicação da fração referente à mancha alta (após a realização do TLC de 40 μ l de saliva semipurificada de *T. infestans*), não produziu efeito de redução do PAC ao longo dos 50 minutos de ensaio. No entanto, a aplicação da fração referente à origem causou uma redução progressiva da amplitude do PAC, sem alterar a fase de repolarização ou duração do PAC, quando comparada com o PACc (FIG. 15). A redução da amplitude do PAC após 50 minutos de ensaio foi de 75%, sendo observada uma recuperação da amplitude do PAC de 69% após 30 minutos de substituição da solução contendo saliva por solução Locke (FIG. 16).

A aplicação da fração referente à mancha alta (após a realização do TLC de 80 μ l de saliva semipurificada de *T. infestans*), não produziu efeito de redução do PAC ao longo dos 50 minutos de ensaio. Entretanto, a aplicação da fração referente à origem ao ensaio, causou após 30 minutos de ensaio, a redução da amplitude do PAC de 100%, sendo observada uma recuperação de 94,0% da amplitude do PAC após 30 minutos da substituição da solução contendo saliva por solução de Locke.

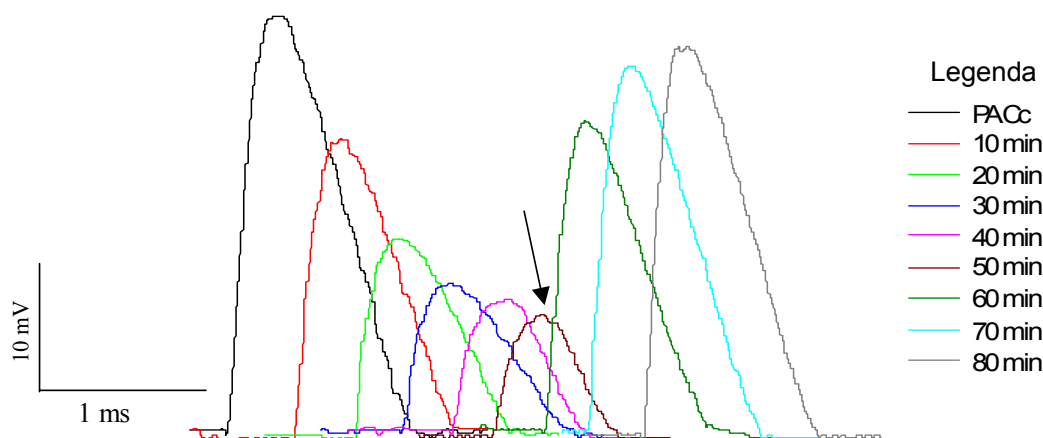


FIGURA 15 – Efeito da adição da fração (origem) da saliva semipurificada de *T. infestans* após TLC, sobre o PAC de nervo isolado de rato. A seta indica o momento da substituição da solução contendo saliva por solução Locke. Note: Recuperação da amplitude do PAC após troca da solução contendo saliva por solução de Locke – lavagem. Legenda: PACc – Potencial de Ação Composto Controle. Min – minutos. mV – milivolts. ms – milissegundos

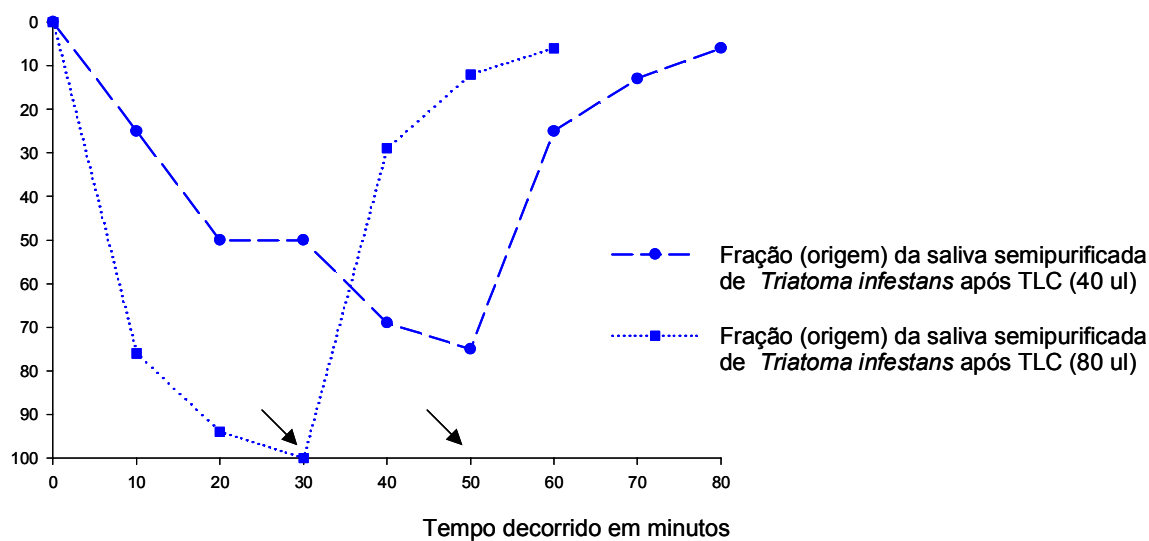


FIGURA 16 – Atividade da fração da saliva semipurificada de *T. infestans* após TLC, sobre o PAC de nervo isolado de rato. Adição das frações (origens) obtidas após TLC das salivas semipurificadas (40 µl e de 80 µl). A seta indica o momento em que a solução contendo saliva foi substituída por solução de Locke.

5.6.3 Saliva semipurificada de *Belostoma anurum*

As frações da saliva semipurificada de *B. anurum* raspadas da placa de sílica gel, foram ressuspensas em 70 µl de solução de Locke acrescida de β -mercaptoetanol (na

concentração final de 10 mM) e aplicadas na preparação de nervo isolado de rato.

A aplicação das frações referentes origem e mancha alta (após a realização do TLC de 40 μ l de saliva semipurificada de *B. anurum*) produziram uma redução na amplitude do PAC de 12% e 10% respectivamente, após 50 minutos de ensaio (FIG. 17). Esta redução não alterou a fase de repolarização ou duração do PAC, quando comparada com o PACc. A recuperação da amplitude do PAC observada, nos ensaios, foi de 2% após 30 minutos de substituição da solução contendo saliva por solução Locke (FIG. 17).

A aplicação da fração referente à mancha alta (após a realização do TLC de 80 μ l de saliva semipurificada de *B. anurum*) não produziu efeito de redução do PAC ao longo dos 50 minutos de ensaio. A aplicação da fração referente à origem causou uma redução de 12% na amplitude do PAC, após 50 minutos de ensaio (FIG. 17). Esta redução não provocou alterações na fase de repolarização e duração do PAC, quando comparada com o PACc. Após 30 minutos de lavagem foi observada uma recuperação de 6% da amplitude do PAC (FIG. 17).

Para verificar se a atividade (porcentagem de redução da amplitude do PAC) da biomolécula presente na saliva semipurificada de *B. anurum* encontrava-se ativa, quando essa saliva semipurificada foi aplicada na placa de TLC, foi retirada uma alíquota de 35 μ l de saliva semipurificada, de cada amostra da saliva semipurificada utilizada nos ensaios de TLC. Estas alíquotas foram secas na centrífuga de evaporação, ressuspensas em 40 μ l de solução de Locke acrescida de β -mercaptoetanol (na concentração final de 10 mM) e utilizadas no ensaio de nervo ciático isolado de rato, como controle da saliva semipurificada de *B. anurum*. A adição dessas alíquotas causou uma redução na amplitude do PAC de 92% e 93%, respectivamente, após 50 minutos de ensaio (FIG. 18), sendo observada uma recuperação de 77% e 73% da amplitude do PAC, após 30 minutos de lavagem, demonstrando com isso que a

atividade da biomolécula presente na saliva de *B. anurum* encontrava-se ativa no momento da aplicação da saliva semipurificada de *B. anurum* na placa de TLC.

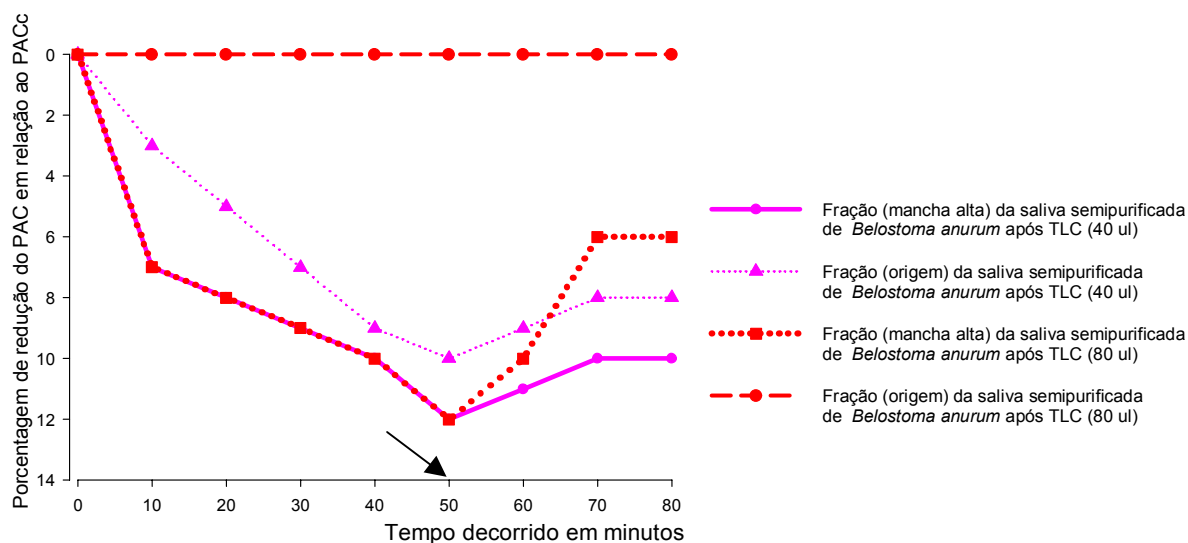


FIGURA 17 – Atividade das frações (mancha alta e origem) da saliva semipurificada de *B. anurum* sobre o PAC após TLC. Adição das frações obtidas após TLC das salivas semipurificada (40 µl e de 80 µl). A seta indica o momento em que a solução contendo saliva foi substituída por solução de Locke. Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle. TLC – Cromatografia de camada fina.

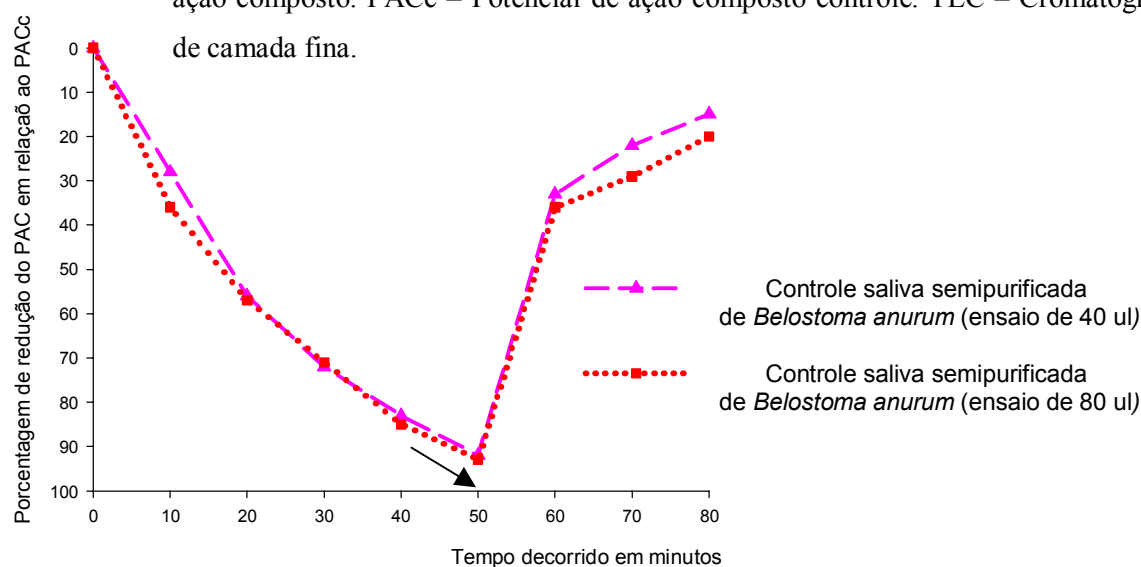


FIGURA 18 – Atividade da saliva semipurificada de *Belostoma anurum* (ensaio controle) sobre o PAC de nervo isolado de rato. As alíquotas foram retiradas das salivas semipurificada utilizadas nos ensaios de atividades das frações obtidas por TLC (40 µl e 80 µl). A seta indica o momento em que a solução contendo saliva foi substituída por solução de Locke. Legenda: PAC – Potencial de ação composto. PACc – Potencial de ação composto controle. TLC – Cromatografia de camada fina.

5.7 ESTABILIDADE DA PREPARAÇÃO DE VASO DORSAL ISOLADO DE *Rhodnius prolixus*

Quando o VD foi colocado em 20 µl de solução salina 0,9%, observou-se que os batimentos cardíacos se mantinham estáveis, mesmo após 24 minutos de ensaio. Aos 32 minutos, os batimentos diminuía, e, quando a solução de salina 0,9% foi trocada, ocorreu um aumento imediato dos batimentos. Quando o VD foi transferido para a lâmina escavada contendo 20 µl de solução de Ringer, a estabilidade do ensaio foi de apenas 5 minutos. Desta forma, os ensaios foram realizados utilizando a solução salina 0,9% (item 4.8).

5.7.1 Saliva de *Triatoma infestans*

Ao adicionar diferentes volumes de saliva bruta de *T. infestans* (0,5 µ, 1,0 µl e 2 µl), na preparação de VD isolado de *R. prolixus* observou-se parada total e imediata do VD. Mesmo após lavagem da preparação com solução salina 0,9%, o VD não voltou a bater (efeito irreversível). O QUADRO 1 resume os resultados encontrados.

5.7.2 Saliva de *Panstrongylus megistus*

Ao adicionar 2 µl de saliva de bruta de *P. megistus* na preparação de vaso dorsal isolado de *R. prolixus* observou-se parada total e imediata do VD, e após lavagem da preparação, com solução salina 0,9%, o VD volta a bater demonstrando um efeito reversível. O QUADRO 1 resume os resultados encontrados.

5.7.3 Saliva de *Belostoma anurum*

Ao adicionar 0,5 µl de saliva bruta de *B. anurum* na preparação de vaso dorsal isolado de *R. prolixus*, observou-se parada total e irreversível, mesmo após lavagem da preparação com solução salina 0,9%.

A adição de 2 µl de saliva semipurificada de *B. anurum* produziu uma parada total e imediata do VD, apresentando um efeito reversível após lavagem com solução salina 0,9%. O QUADRO 1 resume os resultados encontrados.

QUADRO 1

Efeito da saliva dos heterópteros sobre a preparação de vaso dorsal de *Rhodnius prolixus*

Espécie	Quantidade de saliva aplicada (completando o volume final para 20 µl com salina 0,9 %)	efeito
<i>T. infestans</i>	0,5 µl, 1,0 µl e 2 µl de saliva bruta.	Parada total e imediata do VD. Mesmo após 3 minutos de lavagem com solução salina ele não voltou a bater (efeito irreversível).
<i>P. megistus</i>	2 µl de saliva bruta	Parada total e imediata do VD. Após lavagem com solução salina ele voltou a bater (efeito reversível).
<i>B. anurum</i>	~ 0,5 µl de saliva bruta	Parada total e imediata do VD. Mesmo após 3 minutos de lavagem com solução salina ele não voltou a bater (efeito irreversível).
	~ 2 µl de saliva semipurificada	Parada total do VD, e após substituição da saliva por solução salina 0,9%, voltou a bater (efeito reversível).

Discussão

6 DISCUSSÃO

Dan e colaboradores (1999) observaram que a saliva de *T. infestans* possui atividade inibitória irreversível sobre a geração do impulso nervoso, por atuar sobre o canal de sódio. No presente trabalho, foi demonstrado que a saliva de outra espécie de triatomíneo, *P. megistus*, também possui atividade inibitória sobre a geração do impulso nervoso. Uma diferença interessante observada entre essas duas espécies de triatomíneos estudadas é, que, ao contrário do observado na saliva *T. infestans*, a saliva de *P. megistus* causa inibição progressiva da amplitude do PAC, de maneira reversível, atuando de forma semelhante a um anestésico local (por exemplo, a lidocaína).

Cavalcante e colaboradores (2003), em ensaio hemolítico visando demonstrar uma atividade inibidora do sistema de complemento presente na saliva de insetos hematófagos, observaram que, mesmo em altas concentrações, a saliva de *P. megistus* incubada com suspensões de hemácias de carneiro lavadas não causava hemólise, diferente do observado para a saliva de *T. brasiliensis*. Isso sugere que a saliva de *P. megistus* não possui molécula(s) com atividade hemolítica, como, por exemplo, a trialisina, uma proteína formadora de poro presente na saliva de *T. infestans* (AMINO et al., 2002), que é capaz de permeabilizar vários tipos de células levando-as à morte. Essa proteína estaria presente na saliva das espécies do gênero *Triatoma*, o que poderia ajudar a explicar o efeito irreversível observado neste trabalho quando a saliva de *T. infestans* foi adicionada ao ensaio de nervo ciático isolado de rato. Esses dados são reforçados por estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com a saliva de *T. vitticeps* (SOUZA et al., 2003), onde foi observado que, semelhante ao descrito para a saliva de *T. infestans*, a saliva de *T. vitticeps* possui uma atividade inibitória irreversível sobre a amplitude do PAC de nervo ciático de rato, mesmo após 30 minutos de lavagem.

A saliva de *B. anurum* também inibiu a geração do impulso nervoso em nervo ciático isolado de rato, de forma gradual, como nos triatomíneos testados, mas, além de inibir de maneira irreversível a amplitude do PAC, induz alterações na fase de repolarização e um aumento da duração do PAC, sugerindo fortemente a ocorrência de danos na membrana das fibras nervosas. Na saliva dos belostomatídeos, como ocorre em outros heterópteros predadores, encontra-se uma mistura de enzimas digestivas (diversas proteases, lipases, por exemplo) que realizam a pré-digestão externa da presa (COHEN, 1990, 1996; EDWARDS, 1961; MILLES, 1972; PICADO, 1936; REES & OFFORD, 1969; SWART et al., 2006). Nestes insetos predadores, é comum a presença de fosfolipase salivar, presente também em *B. anurum* (Geórgia Atella, comunicação pessoal), cuja função biológica é de lisar as membranas celulares, ajudando na liquefação dos tecidos da presa. A presença de proteases e de fosfolipases na saliva de *B. anurum* poderiam explicar as alterações observadas na fase de repolarização e no aumento da duração do PAC do nervo ciático isolado de rato.

Um dos controles realizados durante os experimentos com a saliva bruta de heterópteros foi a incubação do nervo com solução de Locke diluída (7:1) em água ultrapura (Mille Q). Este controle foi importante para descartar a possibilidade de que os efeitos observados nos ensaios com saliva fossem, em parte, explicados simplesmente por uma diluição de sódio do meio onde se encontravam as fibras nervosas.

Nos experimentos com a saliva semipurificada de *P. megiustus* e de *B. anurum*, observou-se uma reversibilidade da atividade inibitória sobre a amplitude do PAC de nervo isolado de rato. O fato da saliva semipurificada de *B. anurum* não alterar a fase de repolarização nem a duração do PAC da mesma forma que a saliva bruta, sugere a existência, nesta espécie, de uma biomolécula semelhante à encontrada nos triatomíneos, responsável pela ação reversível sobre o PAC. Isso indica que o aquecimento e/ou a ultrafiltração da saliva de *B. anurum* retiram ou inativam a molécula responsável pela lesão irreversível do PAC de

nervo ciático isolado de rato. A ultrafiltração, a extração de lipídeos com solventes orgânicos e o tratamento com proteinase K mostraram que o componente ativo da saliva de *B. anurum* que atua sobre o PAC não é de natureza lipídica e tem peso molecular < 5 kDa.

As diferenças no perfil de atividade (porcentagem de redução da amplitude do PAC) da saliva semipurificada de *B. anurum*, observada nos ensaios de natureza protéica, quando a saliva semipurificada foi tratada e/ou não tratada com duas diferentes concentrações de proteinase K, podem ser atribuídas à perda da atividade da molécula bioativa, quando a saliva é estocada, fenômeno que foi freqüentemente observado durante os experimentos.

O fato da molécula bioativa de *B. anurum* ser provavelmente de natureza não lipídica, semelhante ao resultado obtido com a saliva de *T. infestans*, é bastante interessante, uma vez que a saliva deste inseto é esbranquiçada, viscosa e pouco solúvel em água, com a presença abundante de lipídeos. A existência de enzimas proteolíticas de natureza lipoprotéicas ou conjugadas com lipídeos seria uma adaptação importante para estes predadores aquáticos, pois dificultaria a diluição das enzimas na água, auxiliando a pré-digestão externa da presa no ambiente aquático (PEREIRA, 1992). Entretanto, se pensarmos que a saliva também auxilia na imobilização da presa, seria interessante que a molécula responsável por esta atividade se difundisse rapidamente pelo corpo da presa até o seu alvo, as fibras nervosas e/ou na musculatura.

Torre Bueno (1906) descreveu a ação paralisante da saliva de *B. flumineum* sobre as suas presas. Posteriormente, trabalhos realizados com *B. anurum* demonstraram que a inoculação intravenosa da sua saliva é capaz de matar rapidamente camundongos e hamsters (PEREIRA et al., 1988, 1989). Como a saliva de *B. anurum* produz parada cardíaca em diástole, podendo ser seguida por forte contratura da musculatura cardíaca, em ensaios de coração isolado de cobaia, Dan e colaboradores (1993), sugeriram que este efeito tóxico sobre o coração seria o responsável pelas mortes observadas em camundongos e hamsters.

A fração da saliva semipurificada de *T. infestans*, recuperada da placa de TLC referente à mancha da origem, produziu um efeito de inibição da amplitude do PAC semelhante ao da saliva bruta, porém de forma reversível, o que reforça a idéia de que, além da molécula responsável pela inibição reversível do canal de sódio, existem uma ou mais moléculas diferentes que fazem com que o efeito se torne irreversível.

Os resultados do presente trabalho são semelhantes ao obtido por Dan (2002), que utilizou o mesmo bioensaio de nervo isolado de rato, com uma proteína purificada de 14 kDa da saliva de *T. infestans*. Na continuação destes estudos, Amino (2002), sugeriu que esta proteína de 14 kDa funcionaria como um carreador de uma pequena molécula (aproximadamente 437 Da), que seria responsável pela atividade biológica sobre PAC do nervo de rato. A grande dificuldade em provar esta hipótese do carreador é excluir a possibilidade de que a molécula menor, também encontrada na saliva de *T. infestans*, seria uma molécula co-purificada com a proteína de 14 kDa. Embora os resultados aqui apresentados não resolvam definitivamente a questão sobre o papel da “proteína de 14 kDa”, eles confirmam a presença de molécula(s) de baixo peso molecular (< 5 kDa) na saliva de *T. infestans*, com a mesma atividade característica sobre o PAC descrita anteriormente por Dan (2000) e Amino (2002). Além do baixo peso molecular, os ensaios realizados com a saliva semipurificada sugerem que a molécula bioativa sobre o PAC é termoresistente e de natureza não lipídica.

Ao contrário do observado para *T. infestans*, as frações da saliva semipurificada de *B. anurum* recuperadas da placa de sílica gel depois da TLC produziram uma atividade de redução da amplitude do PAC, pouco expressiva. Fato este que contraria também, os resultados obtidos nos ensaios controle, no qual, as duas alíquotas de saliva semipurificada de *B. anurum*, apresentaram expressivas atividades de redução da amplitude do PAC, demonstrando que a atividade da biomolécula presente na saliva de *B. anurum* encontrava-se

ativa quando a saliva semipurificada foi aplicada sobre a placa de TLC. Provavelmente, ou houve perda da atividade da biomolécula durante o seu contato com a fase móvel utilizada na TLC ou perda de material devido a sua forte interação com a placa de sílica gel ou ainda por oxidação ou mesmo a molécula responsável pela atividade de redução da PAC não se cora pelo vapor de iodo, poderiam explicar a pequena atividade sobre o PAC, observada quando as frações da saliva semipurificada de *B. anurum* recuperadas da placa de TLC foram utilizadas nos ensaios de nervo ciático isolado de rato.

Os resultados aqui obtidos com a utilização de saliva semipurificada demonstram, de forma clara, que os heterópteros *P. megistus*, *T. infestans* e *B. anurum* realmente possuem na sua saliva molécula(s) bioativa(s) sobre o PAC do nervo ciático de rato. É interessante ressaltar que, em todos eles, o(s) componente(s) da saliva semipurificada são termoresistentes, menores que 5 kDa e apresentam uma atividade reversível sobre a amplitude do PAC, sem alterar sua repolarização e duração. Quando a saliva bruta de *P. megistus* e a saliva semipurificada de *B. anurum* foram testadas sobre a preparação de vaso dorsal de *R. prolixus*, produziram uma parada total e reversível das contrações musculares.

A ação da saliva semipurificada de *B. anurum* e da saliva bruta de *P. megistus* na preparação do vaso dorsal de *R. prolixus*, cessando os batimentos de forma imediata e reversível, sugere que esta(s) biomolécula(s) poderia(m) estar envolvida(s) também na atividade paralisante da saliva e que estas atividades poderiam ter um mesmo mecanismo de ação. Esta suposição é reforçada pelo trabalho de Dan e colaboradores (1999), que demonstraram que a atividade saliva de *T. infestans*, reduzindo a amplitude do PAC de nervo isolado de rato, era devida à um bloqueio da corrente de sódio. Uma ação bloqueadora sobre os canais de sódio da musculatura de *R. prolixus* também poderia explicar a parada dos batimentos observada na preparação do vaso dorsal. Entretanto, experimentos

complementares são necessários para comprovar se as atividades observadas são devido à atuação das biomoléculas diretamente sobre os canais de sódio.

Outra evidência de um mecanismo de ação único para a atividade sobre a condução do impulso nervoso em rato e sobre a musculatura de inseto, seria o relato do processo de hemolinfagia por triatomíneos Ryckman (1951) observou que as ninfas que eram sugadas permaneciam paradas durante todo o processo de alimentação e aparentemente não sofriam danos em consequência desse tipo de alimentação e não morriam. Em condições de laboratório, durante o processo de hemolinfagia dos triatomíneos, não se observa a pré-digestão dos tecidos e nem a morte dos artrópodos sugados, apenas uma imobilização temporária dos mesmos (Noireau, F. em comunicação pessoal). Desta forma, sugere-se a saliva dos triatomíneos atuaria tanto como anestésico, se depositada na pele do hospedeiro vertebrado, como paralisante, se injetada em invertebrados.

É interessante ressaltar que a hemolinfagia também foi verificada em fêmeas de mosquitos, quando Harris e colaboradores (1969) demonstraram que, em condições de laboratório, *Aedes aegypti* e *Culex tarsalis* podiam se alimentar de fluidos de larvas de insetos (lepidópteros) e produzirem ovos viáveis.

Nesse contexto, podemos pensar na hematofagia como uma especialização da predação, onde, ao invés de utilizar a saliva para predação (paralisar e digerir tecidos) um pequeno invertebrado, a saliva é utilizada para anestésiar e obter o sangue repetidas vezes de um vertebrado que, comparativamente, é uma fonte estável e quase inesgotável de alimento (AMINO, 2002).

Portanto, considerando estes parâmetros, a nossa hipótese de que a atividade paralisante dos heterópteros predadores e a atividade anestésica encontrada nos hematófagos compartilhariam das mesmas biomoléculas e que foram mantidas durante a evolução destes

grupos, pode estar correta. Entretanto, somente a caracterização molecular do princípio responsável por estas atividades poderá confirmar definitivamente a nossa hipótese.

Uma dificuldade para atingir este objetivo é a natureza das moléculas bioativas estudadas, que provavelmente não são de natureza protéica, o que impossibilita a sua produção por meio de recombinação gênica ou por síntese de peptídeos. Além disso o pequeno volume obtido dessas moléculas por inseto torna o trabalho laborioso e dificulta a sua análise por técnicas como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear.

Estudos sobre atividades presentes na saliva de insetos, como os do presente trabalho, poderão, após a completa caracterização das moléculas bioativas, produzir informações relevantes sobre a estrutura molecular e função biológica das mesmas, bem como fornecer novos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou inseticidas.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- A saliva de *T. infestans* e de *B. anurum* inibe de forma gradual e irreversível a amplitude do PAC, porém a saliva de *B. anurum* interfere na repolarização e duração do PAC de nervo ciático isolado de rato.
- Tanto a saliva bruta como a saliva semipurificada de *P. megistus* inibem de forma gradual e reversível a amplitude do PAC, sem alterar a repolarização e duração do PAC de nervo ciático isolado de rato.
- A saliva semipurificada de *T. infestans* e *B. anurum* inibe de forma gradual e reversível a amplitude do PAC, sem alterar a repolarização e a duração do PAC de nervo ciático isolado de rato.
- A saliva de *T. infestans* e *B. anurum* provocam parada irreversível dos batimentos do vaso dorsal de *R. prolixus*.
- A saliva de *P. megistus* provoca parada reversível dos batimentos do vaso dorsal de *R. prolixus*.
- A saliva semipurificada de *B. anurum* provoca parada reversível dos batimentos do vaso dorsal de *R. prolixus*.

- A molécula bioativa com ação sobre o PAC de nervo ciático de rato presente na saliva de *T. infestans*, *P. megistus* e *B. anurum* é termoresistente, menor do que 5 kDa.
- A molécula bioativa com ação sobre o PAC de nervo ciático de rato presente na saliva de *T. infestans* e *B. anurum* provavelmente não é de natureza lipídica.
- A molécula bioativa com ação sobre o PAC de nervo ciático de rato presente na saliva de *B. anurum* provavelmente não é de natureza protéica.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, J. W.; WYGODZINSKY, P. **Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera)**. 1951, 178p. Monografia – Instituto de Medicina Regional, Universidade Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, 1951.

ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHUCK, P.; RIBEIRO, J. M. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 7, p. 4611-17, Fev. 2003.

AMINO, R. **Interações parasito hospedeiro na tripanossomíase americana: o papel da saliva de *Triatoma infestans***. 2002. 161f. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

AMINO, R.; PORTO R. M.; CHAMMAS, R.; EGAMI, M. I.; SCHENKMAN, S. Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 38, p. 24575-82, Set. 1998.

AMINO, R.; MARTINS, 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, n. 8, p. 6207-13, Fev. 2002.

BOYD, D. W. Digestive enzymes and style morphology of *Deraeocoris nigrutilus* (Uhler) reflecti adaptations for predatory habits. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, n.96, v. 5, p. 667-71, Set. 2003.

BOYD, D. W.; COHEN, A. C.; ALVERSON, D. H. Digestive enzymes and style morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a predacious plant bug. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, n. 95, v. 3, p. 395-401, Maio. 2002.

BRUMPT, E. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 7, p. 702-05, Dez.1914.

CATTERALL, W. A. Neurotoxin that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 20, p. 15-43, Abr. 1980.

CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. **Science**. v. 242, n.7, p. 50-61, Out. 1988.

CAVALCANTE, R.R., PEREIRA, M.H., GONTIJO, N.F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. **Parasitology**, v. 127, n.1, p. 87-93, Jan. 2003.

CHIANG, R.G.; CHIANG, J.A.; DAVEY, K.G. Morphology of the dorsal vessel in the abdomen of the blood feeding insect *Rhodnius prolixus*. **J. Morphol.** v. 204, n. 1, p. 9-23. 1990.

COHEN, A. C. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 83, n. 6, p. 1215-1223, Jun. 1990.

COHEN, A. C. Plant Feeding by predatory Heteroptera: evolutionary and adaptational aspects of trophic switching. In: WIEDENMANN, R.N.; ALOMAR, O. **Zoophytophagous Heteroptera: Implications for life history and integrated pest management**. 1. ed. Lanham: Entomological Society of America, 1996. p. 1-17.

COLL, M.; GUESRSOHN, M. Omnivory in terrestrial arthropods: Mixing plant and prey diets. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 267-97, Jan. 2002

COSTA, J.; FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p. 87-90, Fev. 2007.

COSTANZO, L. S. Neurofisiologia In: COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 3, p. 52-91.

COX, J. J.; REIMANN, F.; NICHOLAS, A. K.; THORNTON, G.; ROBERTS, E., SPRINGELL, K. K.; KARBANI, G.; JAFRI, H.; MANNAN, J.; RAASHID, Y.; AL-GAZALI, L.; HAMAMY, H.; VALENTE, E. M.; GORMAN, S.; WILLIAMS, R.; MCHALE, D. P.; WOOD, J. N.; GRIBBLE, F. M.; WOODS, C.G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 894-8, Dez. 2006.

CRUZ, J. S.; COTTA, G.; DINIZ, C. R.; BEIRÃO, P. S. L. Partial purification and pharmacological characterization of a neurotoxic fraction isolated from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 11, p. 2653-59, Nov. 1994.

CULLEN, M. J. The biology of giant water bugs (Hemiptera: Belostomatidae) in Trinidad. **Proc. R. Ent. Soc. Lon.**, v. 44, p.123-36. 1969.

DAN, A. **Identificação, purificação e caracterização de uma proteína da saliva de *Triatoma infestans* com a atividade bloqueadora sobre a geração do impulso nervoso.** 2000. 112f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DAN, A.; PEREIRA, M. H.; MELO, A. L.; AZEVEDO, A. D.; FREIRE-MAIA, L. Effects induced by saliva of the aquatic hemipteran *Belostoma anurum* on the isolated guinea-pig heart. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 106, n. 1, p. 221-8, Set. 1993.

DAN, A., PEREIRA M. H, PESQUERO J. L, DIOTAIUTI L, BEIRAO P. S. L. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. **J. Med. Entomol.**, v. 36, n. 6, p. 875-9, Nov. 1999.

DE CARLO, J. M., PELLERANO, G. N. & MAGGESE, M. C. Anatomia microscópica del tracto digestivo y glandulas salivares de *Lethocerus mazzai* (Hemiptera/Belostomatidae) **Physis**, v. 32, p. 295-314, 1973.

DE PAULA, A. S.; DIOTAIUTI, L.; SCHOFIELD, C. J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mol Phylogenet. Evol.**, v. 35, n. 3, p. 712-8, Mar. 2005.

EDWARDS, J. S. The action and composition of the saliva of an assassin bug *Platymeris rhadamanthus* Gaerst (Hemiptera/Reduviidae) **J. Exp. Biol.**, v. 38, n. 1, p. 61-77, Mar. 1961.

FAURE-FREMIET, E. Contribution à l'étude des glandes labiales des hydrocorises. **Ann. Sci. Nat.** (9.o. Ser. 2, Zool.), v. 12, p. 215-239, 1910.

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, n. 17, p. 12639-50, Abr. 2000.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C.; BAENA, M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). **Zootaxa**, v. 670, p. 1-12, Out. 2004.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. S.; JUBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1909 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1-36, Maio. 2003.

GARCIA-AVILA, I.; VIVAR-GUZMAN, R.; QUEZADA-MARQUEZ, J.; HUAMAN-MAYTA, P. Aquatic insects that are bioregulators of mosquito larvae present in Pantanos de Villa, Lima, Peru. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 48, n. 3, p. 227-8. 1996.

HARRIS, P; RIORDAN, D. F.; COOKE, D. Mosquitoes feeding on insect larvae. **Science**. v. 164, n. 3876, p. 184-85, Abr. 1969.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R.I. Anticoagulants and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* Stål. **Nature**, v. 201, n. 4923, p. 1008-9, Mar. 1964.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Prolixin-S and Prolixin-G: to anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stål. **Nature**, v. 207, n. 4994, p. 265-67, Jul. 1965.

HYPISA, V.; TIETZ, D. F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R. O. M.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 23, n. 3, p. 447-57, Jun. 2002.

KALVACHOVÁ, P.; HRIBALOVÁ, V.; KODYM, P.; VOLF, P. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). **J. Med. Entomol.**, v. 36, n. 3, p. 341-44, Maio. 1999.

KUTCHAI, H. C. Geração e Condução dos Potenciais de Ação. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 3, p. 29-41.

LAVOPIERRE, M. M.; DICKERSON, G.; GORDON, R. M. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 53, p. 235-50, Jun. 1959.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) and their significance as vector of Chagas' disease. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 163, n. 3, p. 125-520. 1979.

LOROSA, E. S.; JURBERG, J.; SOUZA, A. L.; VINHAES, M. C.; NUNES, I. M. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol.Vect.**, v. 7, n. 4, p. 287-296, Out-Dez. 2000.

MEBLINGER, K. What is a nociceptor ? **Der. Anaesthetist.** v. 46, n. 2, p. 142-53, Fev. 1997.

MELLINK, J. J.; BONVENKAMP, W. V. Funcional aspects of mosquito salivation in blood feeding in *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v. 41, p. 110-15, 1981.

MILES, P.W. The saliva of Hemiptera. **Adv. Insect Physiol.**, v. 9, p. 183-256, 1972.

MILES, A.; ARIAS, J. R.; DE SOUZA, A.; PÓVOA, M. Chagas disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Para state, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 18, n. 4, p. 266-78, Jul. 1981.

NIESER, N.; ALKINS-KOO, M. **The water bugs of Trinidad and Tobago**. St. Augustine: University of the West Indies, 1991. 127p.

NIESER, N.; MELO, A.L. **Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais: guia introdutório com chave de identificação para as espécies de Nepomorpha e Gerromorpha**. Belo Horizonte: UFMG, 1997. 180p.

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, n. 48, p. 28629-34, Dec. 1995.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRATZCHMAR, J.; HAENDLER, B.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; VERHALLEN, P.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W. D. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 7, p. 5050-53, Fev. 1994.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações In: BOGLIOLO, L. **Patologia**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, Cap. 7, p. 112-48.

PEREIRA, M. H. **Avaliação da capacidade predatória e aspectos da biologia de *Belostoma anurum* e *Belostoma plebejum* (Hemiptera, Belostomatidae), em laboratório**. 1992. 117f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PEREIRA, M. H.; PENIDO, C. M.; MARTINS, M. S.; DIOTAIUTI, L. Comparative kinetics of bloodmeal intake by *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, the two principal vectors of Chagas disease. **Med.Vet. Entomol.**, v. 12, n. 1, p. 84-8, Jan. 1998.

PEREIRA, M. H.; PENIDO, C. M.; MARTINS, M. S.; DIOTAIUTI, L. *Triatoma infestans* is more efficient than *Panstrongylus megistus* in obtaining blood meals on non anaesthetized mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 6, p. 765-7, Nov-Dez.1995.

PEREIRA, M. H.; DAN, A.; HERMÉTO, M. V.; BICALHO, R. S.; MELO, A.; PEREIRA L. H. Estudos preliminares da ação da saliva de *Belostoma* sp. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 40, 1988, São Paulo. **Anais de resumos dos trabalhos apresentados na reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, São Paulo: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1988. v.1.

PEREIRA, M. H.; DAN, A.; HERMÉTO, M. V.; MELO, A., PEREIRA L. H.; COSTA, J. L.; FREIRE-MAIA, L. Injeção de saliva de *Belostoma harrisi* induz arritmias cardíacas, hipotensão arterial e morte em hamsters anestesiados. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 4, Caxambu. **Anais de resumos de Caxambu**, Caxambu: Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 1989, p. 120.

PEREIRA, M. H.; SILVA, R. E.; AZEVEDO, A. M.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 35, n. 5, p. 405-9, Set-Out. 1993.

PEREIRA, M. H.; SOUZA, M.E.L.; VARGAS, A. P.; PENIDO, C.M.; MARTINS, M. S.; DIOTAIUTI, L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). **Acta Trop.**, v. 61, n. 3, p. 255-61, Maio. 1996.

PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F.; GUARNERI, A. A.; SANT'ANNA, M.R.; DIOTAIUTI, L. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 11, p. 516-20, Set. 2006.

PEREZ, R.; PANZERA Y.; SCAFIEZZO, S.; MAZZELLA, M. C.; PANZERA P.; DUJARDIN, J. P. & SCVORTZOFF, E. Cytogenetics as a tool for triatominae species distinction (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 353-61, Jul-Set. 1992.

PICADO, C. T. Estudo experimental sobre o veneno de *Lethocerus Del-Pontei* (DeCarlo) (Hemiptero/Belostomatidae). **Memórias do Instituto Butantan**, Tomo X, p. 303-10. 1935/36.

PONTIER, J. P.; DELPLANQUE, A. Les predateurs de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) molusque vecteur de la Shistosomose em Guadeloupe. **Bull. Soc. Vet. Med. Comp. Lyon.**, v. 78, p. 319-331, 1976.

REES, A. R.; OFFORD, R. E. Studies on the protease and other enzymes from the venom of the *Lethocerus cordofanus*. **Nature**, v. 221, n. 5181, p. 675-77, Fev. 1969.

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents. Dis.**, v. 4, n. 3, p. 143-52. Set. 1995.

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, Jan. 2003.

RIBEIRO, J. M. C.; GARCIA, E. S. The role of salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Biol.**, v. 94, p. 219-30, 1981.

RIBEIRO, J. M. C.; GARCIA, E. S. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. **J. Insect Physiol.**, v. 26, n. 5, p. 303-07. 1980.

RIBEIRO, J. M. C.; NUSSENZVEIG, R. H. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. **FEBS Lett.**, v. 330, n. 2, p. 165-68, Set. 1993.

RIBEIRO, J. M. C.; SARKIS, J. J. F. Anti-thromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. **J. Insect Physiol.**, v. 28, n. 8, p. 655-60. 1982.

RIBEIRO, J. M. C.; WALKER, F. A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 6, p. 2251-57, Dez.1994.

RIBEIRO, J. M. C., MARINOTTI, O.; GONZÁLES, R. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, n. 4, p. 932-36, Dez. 1990.

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*. **Biochem J.**, v. 308, n. 1, p. 243-49, Maio. 1995.

RIBEIRO, J. M. C.; HAZZARD, J. M. H.; NUSSENZVEIG, R. H.; CHAMPAGNE, D. E.; WALKER, F. A. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 539-41, Abr. 1993.

RIBEIRO, J. R. I. Família Belostomatidae Leach, 1815 (Insecta: Hemiptera: Heteroptera): Chave e catálogo de identificação para as espécies ocorrentes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Arq. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, v. 63, n.2, p.247-262, Abr-Jun. 2005.

RUAS-NETO, A. L.; CORSEUIL, E.; CAVALLERI, A. Development of rupestrian triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following hemolymphagy on blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Entomol. Vect.**, v. 8, n. 2, p. 205-16, Abr-Jun, 2001.

RYCKMAN, R. E. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera:Reduviidae). **J. Parasitol.**, v. 37, n.5:1, p. 433-34, Out. 1951.

SANDOVAL, C. M.; JOYA, M. I.; GUTIEREZ, R.; ÂNGULO, V. M. Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. **Med. Vet. Entomol.**, v.14, n. 1, p. 100-1, Mar. 2000.

SANDOVAL, C. M.; DUARTE, R.; GUTIERREZ, R.; ROCHA, DA S.; ÂNGULO, V. M., ESTEBAN, L.; REYES, M.; JURBERG, J.; GALVAO, C. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 137-40, Mar. 2004.

SARKIS, J. J. F.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification, **Biochem. J.**, v. 233, n. 3, p. 885-91, Fev. 1986.

SCHAEFER, C. W. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic questions and some others. **Neotrop. Entomol.**, v. 32, n. 1, p. 1-10, Jan-Mar. 2003.

SCHOFIELD C. J. Density regulation of domestic populations of *Triatoma infestans* in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 6, p. 761-9, 1980.

SCHOFIELD C. J. Biosystematics of the Triatominae. In: M. W. Service; Systematics Association. **Biosystematics of Haematophagous Insects**, v. 37, Oxford: Claredon Press, 1988. Cap. 18, p. 285-312.

SCHOFIELD C. J. **Triatominae, biología y control**. 1. ed. West Sussex: Eurocommunica Publications, 1994. 76p.

SCHOFIELD C. J. Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. UNDRE, México City, p. 45-50, Set. 1995.

SCHOFIELD, C. J.; WILLIAMS N. G.; MARSHALL. T. F. .Density-dependent perception of triatomine bug bites. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 80, n. 3, 351-58, Jun. 1986.

SEVERIN, H. H. P.; SEVERIN, H. C. Habits of *Belostoma* (=Zaitha) *flumineum*, Say and *Nepa apiculata* Uhler, with observations on other closely related aquatic hemiptera. **J. N. Y. Ent. Soc.**, v. 19, p. 99-108, 1911.

SMITH, J. J. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Biol.**, v. 82, p. 93-104, Out. 1979.

SOARES, A. C.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N. F.; DOS SANTOS, V. C.; TEIXEIRA, M. M.; PEREIRA, M. H. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **J. Insect Physiol.**, v. 52, n. 5, p. 468-72, Maio. 2006.

SOUZA, R. C. M; ALVES, C. L.; DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, M. H. Ação da saliva de *Triatoma vitticeps* (Reduviidae; Triatominae) sobre o nervo ciático de rato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 18, 2003, Rio de Janeiro. **Livro de resumos dos trabalhos do Congresso Brasileiro de Parasitologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2003. p. 106.

SWART, C. C.; DEATON, L. E.; FELGENHAUER, B. E. The salivary gland and salivary enzymes of the giant waterbugs (Heteroptera; Belostomatidae). **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr Physiol.**, v. 145, n. 1, p. 114-22, Set. 2006

TORRE BUENO, J. R. **De la Life-histories of North-American water-bugs**. *Canad. Ent.*, v. 38, p. 189-97, 1906.

WAXMAN, S. G. A channel sets the gain on pain. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 831-2, Dez. 2006.