

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de
Rhodnius prolixus, *Panstrongylus megistus* e
Triatoma infestans (Hemiptera, Triatominae)**

por

Ana Carolina Borella Anê

**Belo Horizonte
Fevereiro / 2011**

TESE

DDIP – CPqRR

A.C.B.ANHÊ

2011

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de
***Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e**
***Triatoma infestans* (Hemiptera, Triatominae)**

por

Ana Carolina Borella Anê

Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientação: Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Belo Horizonte
Fevereiro / 2011

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A596e Anhê, Ana Carolina Borella.
2011

Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Triatominae) / Ana Carolina Borella Anhê. – Belo Horizonte, 2011.

xvii, 152 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 153 - 169

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doença de Chagas/prevenção & controle 2. *Rhodnius*/anatomia & histologia 3. *Triatoma*/ultraestrutura 4. *Panstrongylus*/citologia I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 3

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de
Rhodnius prolixus, *Panstrongylus megistus* e
Triatoma infestans (Hemiptera, Triatominae)**

por

Ana Carolina Borella Anhô

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Presidente)

Profa. Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Guarneri

Prof. Dr. Maurílio José Soares

Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado

Suplente: Profa. Dra. Luciana da Conceição Pinto

Tese defendida e aprovada em: 21/02/2011

*Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e
corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar
do que errar por omitir.*

Augusto Cury

Dedico

*Aos meus pais queridos, Vera e Sérgio,
pelo esforço constante de proporcionar
aos filhos o bem mais valioso: o estudo.*

*Aos meus irmãos, Júnior e Bruno,
pelo carinho e companheirismo.*

*Ao meu noivo, Paulo Henrique,
pelo amor incondicional, apoio
e compreensão.*

Eu amo vocês!

Agradecimentos

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

Meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Dr. Paulo Pimenta, pelo convite e por confiar em mim logo no dia que nos conhecemos. Muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de realizar pesquisa numa instituição tão bem conceituada e num laboratório tão bem equipado.

A Dra. Nágila Secundino, chefe do Laboratório de Entomologia Médica, por proporcionar a infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Soares, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo carinho e mão amiga.

A todos os meus queridos amigos do LEM, em especial à Alessandra, Bruno, Fernanda, Junara, Marcele e Vanessa, pela convivência agradável, pelas risadas e pela mão amiga sempre disposta a ajudar. Obrigada por terem se tornado a minha família aqui de BH.

À Carol Cunha, Alessandra, Rafael e Dra. Nágila, pelo auxílio nos experimentos com as bactérias.

As minhas queridas amigas e orientadas, Janes e Nadja, pela ajuda, pela amizade e carinho, pelo aprendizado adquirido ao ensinar vocês.

À Érika e à Roberta, secretárias do LEM, que sempre se mostraram dispostas a ajudar.

Um agradecimento especial à Luciana Pinto e a toda a sua família, que nos acolheram com muito carinho na sua residência.

Aos amigos do LATEC, representados pela Dra. Liléia, que me receberam com carinho no laboratório, possibilitando todos os suportes para criação dos triatomíneos no insetário. Em especial, ao Ademilson, técnico responsável pelo insetario, muito obrigada pelos ensinamentos na manutenção da colônia e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, representado pelo Dr. Rodrigo Corrêa, pela disposição das condições materiais e pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa para o desenvolvimento deste projeto.

Ao pessoal da manutenção do CPqRR, que sempre esteve disposto a ajudar e a socorrer nas emergências.

Ao Biotério do CPqRR, pelo fornecimento dos animais utilizados para alimentação dos insetos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, representado pelo Dr. Paulo Pimenta, pela oportunidade de cursar o doutorado e por todo o aprendizado durante a minha formação.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Alessandra Guarneri e Dr. Marcos Horácio, pelas valiosas contribuições e correções durante o exame, e aos membros da banca da defesa, pela disponibilidade, atenção e pelas sugestões e comentários que serão apresentados.

Aos meus queridos pais, Sérgio e Vera, por sempre me incentivarem na conquista dos meus sonhos, nos estudos e na pesquisa. Muito obrigada por me ensinarem a enfrentar as dificuldades sem receio, pelo carinho e amor, e por todo o esforço e dedicação na educação dos filhos. Vocês são o meu alicerce!

Aos meus queridos irmãos e amigos, Júnior e Bruno, e a minha cunhada Kelly, pelas risadas e brincadeiras, por fazerem valer a pena cada minuto quando nos encontramos. Muito obrigada por todo esse carinho e união que existe entre a gente.

Ao meu noivo Paulo Henrique, meu anjo, meu companheiro, meu amigo. Muito obrigada por todo apoio e confiança desde o momento que pensei em fazer o doutorado em BH. Agradeço também pela compreensão, pelo incentivo, pela ajuda e pelo carinho. A distância que nos separou serviu simplesmente para fortalecer o amor que existe entre nós.

À minha família e à família do Paulo (minha segunda família), que sempre torceram pelo meu sucesso e vibraram por cada conquista. Em especial a minha vizinha querida, vó Rosa, que tanto rezou para que tudo desse certo e que lá do céu está feliz pela conclusão deste trabalho.

E, finalmente a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades oferecidas e pela iluminação em mais uma etapa vencida.

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 Introdução	18
1.1 Triatomíneos	18
1.2 Importância epidemiológica	19
1.3 Glândula salivar	21
1.4 Inervação da glândula salivar e controle aminérgico e peptinérgico da salivação	23
1.5 Saliva	25
1.6 Endossimbiontes dos triatomíneos	26
2 Justificativa	29
3 Objetivos	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4 Metodologia	31
4.1 Triatomíneos	31
4.1.1 Manutenção dos insetos	31
4.1.2 Espécies utilizadas	31
4.2 Dissecção e retirada das glândulas salivares	32
4.3 Obtenção da saliva de <i>T. infestans</i>	33
4.4 Processamento para microscopia	33
4.4.1 Microscopia de luz	33
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura	34
4.4.3 Microscopia de fluorescência e <i>laser</i> confocal	35
4.5 Amplificação do gene universal bacteriano DNA ribossomal 16S	36
4.5.1 Extração do DNA	36
4.5.2 Amplificação por PCR	37

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
5 Resultados	38
5.1 Observação das glândulas salivares ao estereoscópio	38
5.2 Histologia das glândulas salivares	38
5.2.1 <i>R. prolixus</i>	38
5.2.2 <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	40
5.3 Microanatomia da superfície e do epitélio secretor das glândulas salivares	41
5.3.1 <i>R. prolixus</i>	41
5.3.2 <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	42
5.4 Marcação nuclear e do citoesqueleto das glândulas salivares	43
5.5 Imunomarcção das fibras nervosas presentes nas glândulas salivares	46
5.5.1 <i>R. prolixus</i>	46
5.5.2 <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	47
5.6 Amplificação do gene universal bacteriano DNA ribossomal 16S	48
6 Discussão	111
6.1 Caracterização morfológica da glândula salivar de <i>R. prolixus</i> , <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i> durante o desenvolvimento pós-embrionário	111
6.2 Caracterização da inervação da glândula salivar de <i>R. prolixus</i> , <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i> durante o desenvolvimento pós-embrionário	116
6.3 Detecção das bactérias presentes no lóbulo posterior de <i>T. infestans</i>	119
7 Conclusões	121
8 Anexos	123
8.1 Anexo 1 – Artigo no prelo	123
8.2 Anexo 2 – Anhô & Azeredo-Oliveira, 2008	138
9 Referências Bibliográficas	153

Lista de figuras

Figura da capa -	Micrografia de varredura do epitélio secretor da glândula salivar de <i>R. prolixus</i>	i
Figura 1 -	Triatomíneos das espécies <i>R. prolixus</i> , <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	49
Figura 2 -	Imagens estereoscópicas dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i> , <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	51
Figura 3 -	Cortes histológicos dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i> corados com Azul de Toluidina	53
Figura 4 -	Cortes histológicos do lóbulo principal de <i>R. prolixus</i> corados com Azul de Toluidina	55
Figura 5 -	Cortes histológicos do lóbulo principal de <i>R. prolixus</i> (adulto alimentado) corados com Azul de Toluidina	57
Figura 6 -	Cortes histológicos dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i> (adulto macho) corados pelo PAS (A-D) e pelo Azul de Bromofenol (E-H)	59
Figura 7 -	Cortes histológicos dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i> (adulto macho) corados com Azul de Toluidina	61
Figura 8 -	Cortes histológicos dos lóbulos salivares de <i>T. infestans</i> (adulto macho) corados com Azul de Toluidina	63
Figura 9 -	Presença de bactérias no lóbulo salivar posterior e na saliva de <i>T. infestans</i> ..	65
Figura 10 -	Cortes histológicos dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i> (adulto macho) corados pelo PAS (A-F) e pelo Azul de Bromofenol (G-L)	67
Figura 11 -	Cortes histológicos dos lóbulos salivares de <i>T. infestans</i> (adulto macho) corados pelo PAS (A-F) e pelo Azul de Bromofenol (G-L)	69
Figura 12 -	Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i> durante o ciclo de vida (ninfas [N] e adulto)	71
Figura 13 -	Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i> (adulto alimentado)	73
Figura 14 -	Micrografias de varredura do lóbulo salivar fraturado de <i>R. prolixus</i> (ninfa de quinto estágio em jejum)	75
Figura 15 -	Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i>	77
Figura 16 -	Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de <i>T. infestans</i>	79
Figura 17 -	Micrografias de varredura dos lóbulos salivares fraturados de <i>T. infestans</i> e <i>P. megistus</i>	81
Figura 18 -	Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i>	83
Figura 19 -	Marcação nuclear dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i>	85
Figura 20 -	Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i> (adulto alimentado)	87

Figura 21 -	Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i>	89
Figura 22 -	Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de <i>T. infestans</i>	91
Figura 23 -	Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	93
Figura 24 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i>	95
Figura 25 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) e marcação das fibras musculares dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i>	97
Figura 26 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti-tirosina-hidroxilase) dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i>	99
Figura 27 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti-dopamina) dos lóbulos salivares de <i>R. prolixus</i>	101
Figura 28 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i>	103
Figura 29 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) dos lóbulos salivares de <i>T. infestans</i>	105
Figura 30 -	Imunomarcção das fibras nervosas (anti- tirosina-hidroxilase) dos lóbulos salivares de <i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i>	107
Figura 31 -	Imagem do gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 2%, resultante da amplificação do gene universal bacteriano DNAr 16S	109

Lista de Tabelas

Tabela 1	- Medidas do comprimento do lóbulo principal (LP) de ninfas (N) e adulto (Ad) de <i>R. prolixus</i> em jejum (J) e alimentado (A)	41
Tabela 2	- Medidas do comprimento dos lóbulos anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de <i>P. megistus</i>	42
Tabela 3	- Medidas do comprimento dos lóbulos anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de <i>T. infestans</i>	43
Tabela 4	- Contagem do número de células do lóbulo principal nos estágios de ninfa (N) e adulto (Ad) de <i>R. prolixus</i> em jejum (J) e alimentado (A)	45
Tabela 5	- Contagem do número de células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de <i>P. megistus</i>	45
Tabela 6	- Contagem do número de células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de <i>T. infestans</i>	45
Tabela 7	- Medidas das áreas nucleares das células do lóbulo principal nos estágios de ninfa (N) e adulto (Ad) de <i>R. prolixus</i> em jejum (J) e alimentado (A) ..	46
Tabela 8	- Medidas das áreas nucleares das células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de <i>P. megistus</i>	46
Tabela 9	- Medidas das áreas nucleares das células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de <i>T. infestans</i>	46

Lista de abreviaturas e símbolos

ADP: adenosina difosfato
AMP cíclico: Adenosina Cíclica-3',5'-Monofosfato
BSA: albumina sérica bovina
C6/36: linhagem contínua de células oriundas de larvas de *Aedes albopictus*
CO₂: gás carbônico
DAPI: 4,6 diamino-2-fenilindol
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNAr: DNA ribossomal
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DEPC: dietilpirocarbonato
FITC: isotiocianato de fluoresceína
g: grama
h: hora
Hz: hertz
L: litro
LPC: lisofosfatidilcolina
M: massa molar
mg: miligrama
mL: mililitro
mm: milímetro
NaOH: hidróxido de sódio
ng: nanograma
NO: óxido nítrico
NP: nitroforina
PAS: *Periodic Acid Schiff*
pb: pares de base
PBS: tampão fosfato
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
RNA: ácido ribonucléico
RNAm: RNA mensageiro
RNAr: RNA ribossômico
RNAt: RNA transportador

rpm: rotação por minuto

RPMI: meio de cultura desenvolvido pelo "Roswell Park Memorial Institute"

V: volts

μ L: microlitro

μ m: micrometro

%: porcentagem

$^{\circ}$ C: graus Celsius

Resumo

Os triatomíneos são vetores do *Trypanosoma cruzi* e do *Trypanosoma rangeli*. Apresentam hábito hematófago durante todo o ciclo de vida. Durante o repasto, secretam uma saliva que antagoniza os sistemas hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro vertebrado. A fim de caracterizar os aspectos morfológicos da glândula salivar, foi desenvolvido um estudo do crescimento desse órgão em triatomíneos de três espécies: *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. Os insetos foram cedidos pelo insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (CPqRR - FIOCRUZ). As glândulas salivares foram dissecadas e processadas para microscopia de luz, de fluorescência, *laser* confocal e eletrônica de varredura. Os resultados indicaram que a glândula é morfológicamente semelhante durante todo o ciclo de vida do inseto, sendo formada por um par de lobos, cada qual formado por dois (*R. prolixus*) ou três lóbulos (*P. megistus* e *T. infestans*). Durante o ciclo de vida, a glândula quadruplicou o seu tamanho inicial, devido ao crescimento celular, visto que o número de células permaneceu constante. Os lóbulos se mostraram formados por um epitélio simples que delimita o lúmen (onde a saliva é armazenada), revestidos por fibras musculares (cuja contração permite a liberação da saliva), traquéias e nervos. Serotonina apresentou intensa atividade na glândula das três espécies analisadas durante alimentação. Em *R. prolixus*, atividade dopaminérgica e de tirosina-hidroxilase (enzima da via das catecolaminas) também foram observadas. Dobras de membrana foram visualizadas na região apical das células e associadas ao aumento da área de secreção (tipo merócrina). Além disso, a presença de vesículas de secreção e células inteiras (estas observadas apenas em *R. prolixus*) no lúmen indicaram secreções do tipo apócrina e holócrina, respectivamente. Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foram observadas dentro das células e do lúmen do lóbulo posterior de *T. infestans*.

Abstract

Triatomines are vectors of *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. They are hematophagous during all life cycle. During the bite, they secrete saliva that antagonizes hemostatic, inflammatory and immunological systems imposed by the vertebrate host. In order to understand gland structure, a study of the organ growth was carried out with three important species: *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. The triatomines were provided by the Insectary of the Laboratory of Triatomines and Epidemiology of Chagas Disease (CPqRR - FIOCRUZ). Glands were dissected and processed routinely for light, fluorescence, laser scanning confocal and scanning electron microscopies. The results indicated that the gland is very similar during all cycle. It is formed by a pair of lobes, each one formed by two (*R. prolixus*) or three lobules (*P. megistus* e *T. infestans*). During the life cycle, salivary gland grew four times. This happened because cell volume increased, since the number of cells was the same during all life. The results showed that lobules are formed by a single epithelium that delimits a large central lumen (where saliva is stored), covered by muscle fibers (gland contraction and saliva releasing), trachea and nerves. Serotonin was considered an important neurotransmitter released during feeding, since it showed intense activity in the gland of the three species. In *R. prolixus*, activity of dopamine and tyrosine-hydroxylase (indicative of the presence of catecholamines) were also visualized. Membrane infoldings were observed in the apical surface of the cells, increasing the membrane area available for secretion (merocrine type). In addition, the presence of secretion vesicles and entire cells in the lumen (just in *R. prolixus*) indicated aprocrine and holocrine types of secretion, respectively. Gram-negative and Gram-positive bacteria were observed inside the cells and in the lumen of the posterior lobule of *T. infestans*.

1 Introdução

1.1 Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Há 140 espécies atualmente descritas (Schofield e Galvão, 2009) e elas são encontradas principalmente na América Latina. No Brasil são popularmente conhecidos como barbeiros, pelo fato de geralmente picarem a face descoberta de pessoas adormecidas, pois apresentam hábito noturno.

Os barbeiros são insetos hemimetábolos, cujo ciclo de vida apresenta uma fase de ovo, cinco estádios ninfais e adulto. O inseto é hematófago durante todo o ciclo de vida e a alimentação sanguínea é necessária para que ele atinja o próximo estágio, funcionando como fonte de proteína para que o inseto complete o seu desenvolvimento e produza os ovos (Buxton, 1930). Adultos se diferenciam das ninfas por serem maiores, apresentarem asas completas e aparelho reprodutor totalmente desenvolvido e apto à reprodução.

Dentre os triatomíneos, *Rhodnius prolixus* é o principal vetor da doença de Chagas no norte da América do Sul (principalmente Colômbia e Venezuela), além de ser um importante vetor em países como México, Nicarágua, Guatemala, Honduras, El Salvador, Costa Rica e norte do Panamá (Diotaiuti *et al.*, 2008).

Rhodnius prolixus tem se tornado uma das espécies de triatomíneos mais estudadas, pois são insetos relativamente grandes e de fácil manipulação. Além disso, as colônias desses triatomíneos são facilmente estabelecidas e mantidas. Os machos apresentam tamanho médio de 17-20mm e as fêmeas de 19-22mm (Diotaiuti *et al.*, 2008). Vários fatores tornam o *R. prolixus* um dos vetores mais importantes do *Trypanosoma cruzi*, tais como: acentuada antropofilia, rápido ciclo de desenvolvimento, elevada densidade, intensa dispersão, hábito de defecar logo após alimentação, além de possuir alta susceptibilidade para albergar o *T. cruzi* na natureza (Brener *et al.*, 2000).

Os triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus* são grandes: os machos medem 26-34mm e as fêmeas 29-38mm. Sua coloração geral é negra com manchas vermelhas no pescoço, pronoto, escutelo, cório e conexivo. Além de sua importância na transmissão da doença de Chagas também se destaca historicamente, uma vez que Carlos Chagas dissecou um exemplar dessa espécie e verificou pela primeira vez a presença de formas evolutivas do

Trypanosoma cruzi em barbeiros. Estão associados a regiões de climas mais úmidos e encontrados em grande parte do território brasileiro (Diotaiuti *et al.*, 2008). Segundo Brenner e colaboradores (2000), pode ser considerada a espécie de maior importância no Brasil, por causa da sua ampla distribuição geográfica e elevada suscetibilidade ao *T. cruzi*. Também é encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia.

A espécie *Triatoma infestans* apresenta comprimento de 21-26mm em machos e 26-29mm em fêmea. Sua coloração é negra/marrom-escuro com marcações amarelo claro no cório, conexivo e patas. Trata-se de uma espécie adaptada a viver no ambiente domiciliar no Brasil (Brenner *et al.*, 2000) e é encontrada em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, México, Paraguai, Peru e Uruguai. O Brasil recebeu em 2006 o certificado de interrupção da transmissão da doença de Chagas por esta espécie, sendo atualmente encontrados raros exemplares apenas nos estados do Rio Grande do Sul e Bahia (Diotaiuti *et al.*, 2008).

1.2 Importância epidemiológica

Os triatomíneos apresentam importância epidemiológica por serem vetores do *T. cruzi* e do *Trypanosoma rangeli*.

O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. No ano 2009, foi comemorado o centenário da sua descoberta. Trata-se de um importante fato da ciência brasileira, pois Carlos Chagas descobriu o agente etiológico (*T. cruzi*), sua biologia no hospedeiro vertebrado e invertebrado, seus reservatórios e diversos aspectos da patogenia e sintomatologia da doença (Chagas, 1909; Coura & Pereira, 2010). Tantos esclarecimentos foram resultado da competência de um só estudioso, sem os recursos tecnológicos disponíveis atualmente (Neto & Pasternak, 2009).

Estima-se que existam 12 milhões de infectados pela doença de Chagas na América Latina (Dias, 2009), com cerca de 2,5 milhões no Brasil, com acometimentos de intensidades diversas (Neto & Pasternak, 2009). Além disso, são encontrados indivíduos contaminados em países da Europa e da América do Norte. Esses casos são resultantes da migração de pessoas infectadas em busca de melhores condições de vida. Essa situação leva a riscos de transmissão transfusional, maior demanda por atenção médica, ocorrência de problemas laborais e de seguridade social (Dias & Borges-Dias, 1979; Schmunis & Dias, 2000).

Nos últimos anos, observa-se uma intensa e consistente redução na transmissão da doença de Chagas em humanos, com controle regular do vetor e dos bancos de sangue (Dias, 2009). Vale ressaltar que em 2006 o Brasil recebeu uma certificação concedida pela OPS/OMS relativa à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor (*T. infestans*) e pela via transfusional (Dias, 2006).

A forma mais importante de transmissão da doença de Chagas ainda é a vetorial, mas a transmissão transfusional e a congênita também apresentam importância epidemiológica. A transmissão oral, comum entre animais no ciclo silvestre, é esporádica e circunstancial em humanos e ocorre pela ingestão de alimentos contendo triatomíneos ou suas dejeções. Os surtos aparecem de forma súbita, atingindo um número pequeno de pessoas (Gontijo & Santos, 2009).

Como a doença de Chagas afeta principalmente a população pobre e socialmente marginalizada, as principais ações de controle precisam ser realizadas pelo governo e, por isso, dependem de decisões políticas (Dias, 2007).

O *T. rangeli*, um parasita hemoflagelado que infecta diversas espécies de triatomíneos e mamíferos, inclusive o homem (Cuba, 1998), é patogênico apenas ao inseto-vetor. Esse protozoário infecta vários órgãos do inseto, como intestino, túbulos de Malpighi, cutícula, traquéia, glândulas salivares e sistema nervoso. Os triatomíneos do gênero *Rhodnius* são os principais vetores do *T. rangeli* e a metaciclogênese acontece na glândula salivar do inseto. Quando o triatomíneo realiza o repasto sanguíneo, libera formas metacíclicas com a saliva e essa é a principal via de transmissão do parasita (Marinkelle, 1968; Watkins, 1971; Hecker *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1994; Meirelles *et al.*, 2005). Segundo Garcia e colaboradores (1994), a glândula infectada apresenta redução na atividade da apirase e no conteúdo do óxido nítrico, dois importantes componentes da saliva que possibilitam a localização do vaso sanguíneo durante a fase de sondagem. Essa dificuldade para localizar o vaso faz com que o inseto perfure a pele do hospedeiro mais vezes e se alimente a uma taxa mais lenta, ingerindo menos sangue, quando comparado a insetos não infectados. Assim, os autores sugeriram que a infecção pelo *T. rangeli* module a habilidade do vetor de localizar os vasos sanguíneos por afetar as propriedades anti-hemostáticas da saliva, aumentando, conseqüentemente, a probabilidade de inoculação intradermal dos parasitas nos hospedeiros mamíferos.

Embora a prevalência humana e animal pelo *T. rangeli* não estejam bem estabelecidas, ela acompanha a distribuição geográfica do *T. cruzi* nas Américas Central e do Sul (Ramirez *et al.*, 1998) e, assim, infecções mistas podem dificultar o diagnóstico diferencial das parasitemias (Miles *et al.*, 1983). Além disso, em consequência da grande similaridade entre

os antígenos de superfície dos dois parasitas, pode haver reatividade cruzada e resultar em diagnóstico falso-positivo para a doença de Chagas em regiões onde os parasitas coexistem (Guhl & Marinkelle, 1982; Ross & Novoa-Montero, 1983; Guhl *et al.*, 1987; Basso *et al.*, 1991; Hudson *et al.*, 1992; Saldaña *et al.*, 1995; Saldaña & Sousa, 1996a, b).

1.3 Glândula salivar

A glândula salivar dos triatomíneos desempenha um papel fundamental na vida dos insetos, pois secreta saliva durante todo o processo de hematofagia. Em triatomíneos, a glândula é formada por um par de lobos, cada qual formado por dois (*Rhodnius*) ou três (*Triatoma* e *Panstrongylus*) lóbulos. No gênero *Rhodnius*, os lóbulos são denominados de principal e acessório. O primeiro é maior, alongado e avermelhado, enquanto o segundo é pequeno, arredondado e translúcido (Meirelles *et al.*, 2003). A coloração vermelho-cereja do lóbulo principal deve-se à presença das nitroforinas, responsáveis por muitas das atividades anti-hemostáticas (Montfort *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2000). Em triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*, os lóbulos foram denominados, de acordo com Barth (1954), de D1 (anterior), D2 (mediano) e D3 (posterior). O lóbulo anterior apresenta-se arredondado e amarelado, o lóbulo mediano tem formato alongado e coloração esbranquiçada e o lóbulo posterior é oval e transparente. A glândula salivar se localiza no tórax, onde há espaço suficiente para o seu desenvolvimento. O volume glandular sofre constantes alterações de acordo com a atividade de alimentação do inseto (Barth, 1954).

De cada lobo salivar sai um canal que leva a saliva até a região cefálica (Barth, 1954). De acordo com Wenk e colaboradores (2010), esse canal é chamado de canal salivar aferente. Tem início no hilo e termina na bomba salivar, onde os dois canais aferentes (um de cada lobo) se juntam. Da bomba salivar saem outros dois canais paralelos: o canal eferente dorsal e o ventral. O primeiro leva a saliva até o canal maxilar, que termina na extremidade da maxila e libera saliva na pele do hospedeiro. O segundo canal se abre no tubo labial onde libera saliva. Os autores sugeriram que a saliva também tenha a função de lubrificar os estiletos e limpá-los após a alimentação.

As glândulas salivares dos triatomíneos são formadas por um epitélio glandular voltado para o lúmen e constituído por uma camada simples de células epiteliais apoiadas numa membrana basal. Duas camadas de fibras musculares envolvem externamente a glândula salivar, onde se encontram em associação com traquéias e fibras nervosas. As células

glandulares são caracterizadas por possuírem dois núcleos com acentuada poliploidia, intensa metacromasia citoplasmática e um elevado número de corpúsculos nucleolares, retículos endoplasmáticos, mitocôndrias e vesículas, o que caracteriza células produtoras e secretoras de proteínas. A análise ultra-estrutural dessa glândula também permitiu a visualização de muitas dobras de membrana na região apical da membrana celular, o que aumenta, significativamente, a área disponível para a secreção da saliva (Barth, 1954; Lima-Oliveira, 1997; Lacombe, 1999; Meirelles *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003; Anhô & Azeredo-Oliveira, 2008 [anexo 2]).

Técnicas específicas de microscopia de luz para coloração da cromatina mostraram diferenças no padrão heterocromático nas glândulas salivares dos três principais gêneros de triatomíneos: *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* (Anhô & Azeredo-Oliveira, 2008 [anexo 2]). Em *T. infestans* foi observado o cromocentro, uma massa heterocromática grande e única presente principalmente nos machos. Vários autores acreditam que se trata dos três grandes pares de autossomos e do cromossomo sexual Y (Solari, 1979; Panzera *et al.*, 1992; Perez *et al.*, 1997) que podem estar agrupados nesse corpo heterocromático (Mello, 1971, 1975, 1976). O cromocentro também já foi observado em túbulos de Malpighi (Mello & Recco-Pimentel, 1987) e nas células do túbulo seminífero desta espécie (Azeredo-Oliveira, 1990).

Segundo Tartarotti e Azeredo-Oliveira (1999), nos gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius* foi evidenciado o predomínio de eucromatina e os corpúsculos heterocromáticos foram observados principalmente nos machos. Os autores acreditam que esses corpúsculos correspondam, provavelmente, ao cromossomo Y. Dessa forma, os diferentes padrões de heterocromatinização apresentados por esses gêneros devem constituir parte das diferenças interespecíficas acumuladas no processo evolutivo. Além disso, resultados de outro trabalho mostraram que fêmeas de *T. infestans* e *P. megistus* apresentaram menor quantidade de heterocromatina, o que foi associado ao seu metabolismo mais ativo (Anhô & Azeredo-Oliveira, 2008 [anexo 2]). De acordo com os autores, as fêmeas necessitam ingerir maior quantidade de alimento devido à oviposição e, dessa forma, necessitam de maior secreção salivar para a hematofagia.

A técnica para detecção de fosfatase ácida mostrou a atividade dessa enzima na heterocromatina e no nucléolo (mais intensa) das células glandulares de *T. infestans*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *Rhodnius neglectus*. Os autores sugeriram que essa enzima desempenhe um papel relevante durante a transcrição das moléculas de RNAr no centro fibrilar nucleolar (Anhô *et al.*, 2007). A atividade ATPásica dependente de magnésio também foi detectada nas células glandulares de *T. infestans* e *P. megistus*. Essa atividade foi positiva

principalmente na eucromatina e nos corpúsculos nucleolares, o que, provavelmente, relaciona-se à atuação dessa enzima no processo de transcrição. Resposta positiva também foi evidenciada no envoltório nuclear e associada à função da ATPase no transporte núcleo-citoplasmático de substâncias (Anhê, 2007).

Recentemente, Rocha e colaboradores (2010) desenvolveram uma cultura primária de células de glândula salivar e de ducto de *R. prolixus*. Três tipos de células foram observados, com o predomínio de células binucleadas. O sobrenadante continha proteínas de 16-24KDa e apresentou atividade anticoagulante e de apirase. Além disso, vesículas de secreção foram observadas nas células provenientes do ducto, sugerindo um possível papel secretor desta estrutura.

1.4 Inervação da glândula salivar e controle aminérgico e peptinérgico da salivação

A literatura indica que a glândula salivar dos triatomíneos é inervada pelo sistema nervoso central e pelo estomogástrico (Insausti, 1994; Orchard, 2006). No sistema nervoso central, o nervo salivar surge da base do nervo labial e acompanha os ductos em direção ao tórax, quando se ramifica na glândula. No sistema nervoso estomogástrico, o nervo esofágial (que se estende do esôfago ao promesêntero) envia ramos em direção à glândula (Insausti, 1994; Orchard, 2006). Segundo Lange e colaboradores (1988), a glândula salivar de *R. prolixus* é coberta por um plexo de fibras serotoninérgicas. Além da serotonina, Tsang & Orchard mostraram (1991) que a glândula desse inseto também é estimulada por membros da família das FMRF-amidas, que atuam como neurohormônios.

O controle da salivação pode acontecer por inervação direta de um neurônio ou via neurohormônios (quando o neurotransmissor está livre na hemolinfa). Apesar da inervação da glândula salivar em insetos apresentar muitas variações, algumas substâncias neuroativas, como serotonina e dopamina, parecem favorecer a secreção salivar. Uma ou ambas aminas biogênicas foram identificadas em fibras nervosas associadas a glândulas salivares de gafanhotos, bicho-pau, baratas, percevejos, mariposas, mosquitos e libélulas (Lange *et al.*, 1988; Ali *et al.*, 1993; Elia *et al.*, 1994; Ali & Orchard, 1996a; Ali, 1997). Muitos peptídeos, como os membros da família das FMRF-amidas, também são encontrados associados a glândulas salivares de insetos (Ali, 1997).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é conhecida por regular a atividade de alimentação em vários invertebrados (Long & Murdock, 1983; Lent & Dickinson, 1988; Nässel, 1988; Kaufmann *et al.*, 2004) e mamíferos (Simansky, 1995). Em *R. prolixus*, os estudos mostram que ela coordena vários eventos fisiológicos relacionados à alimentação, como contração da glândula para liberação da saliva, indução da plasticidade da cutícula para acomodar o sangue ingerido, contração dos músculos do sistema digestivo, aumento do ritmo cardíaco e passagem de água e íons pelos túbulos de Malpighi favorecendo a diurese (Orchard, 2006). Lange e colaboradores (1989) mostraram que, durante a hematofagia, a concentração de serotonina na hemolinfa aumentou significativamente, alcançando níveis superiores a 100nM após cinco minutos do início do repasto, comparado a 7nM em insetos em jejum. Neste caso, essa serotonina livre alcançou os tecidos, estimulando-os e atuando como neurohormônio (Orchard & Brugge, 2002).

Catecolaminas também são importantes neurotransmissores. Dentre elas, a dopamina é a amina mais abundante em insetos, enquanto a norepinefrina é encontrada em níveis relativamente baixos e a epinefrina é raramente encontrada (Evans, 1980). Atividade dopaminérgica foi detectada na glândula salivar de gafanhoto (*Locusta migratoria*) (Ali & Orchard, 1996b) e barata (*Periplaneta americana*) (Just & Walz, 1996). Nesta, a dopamina induziu liberação de uma saliva mais diluída e livre de proteínas, enquanto a ativação de receptores serotoninérgicos foi necessária para a secreção de proteínas e enzimas (Just & Walz, 1996). O ducto salivar também foi estimulado por dopamina (Lang & Walz, 1999) e modificou o conteúdo da saliva primária (Rietdorf *et al.*, 2003). Nas glândulas salivares da mariposa *Manduca sexta* também foi observada inervação dopaminérgica (Robertson, 1975), mas apenas as regiões secretoras se mostraram inervadas (Robertson, 1974).

Norepinefrina vem sendo implicada na atividade da glândula salivar de gafanhoto (Baines & Tyrer, 1989), mas em limiares maiores (10^{-6} mol/L) quando comparado a serotonina (10^{-10} mol/L) e dopamina (10^{-9} mol/L) (Ali & Orchard, 1994). Efeitos semelhantes foram obtidos em glândulas de baratas, no qual a norepinefrina mostrou apenas 2% da eficiência da dopamina na indução da salivação (Ali, 1997).

Durante a produção das catecolaminas, a tirosina-hidroxilase é a primeira enzima da via (Evans, 1980). Em bicho-pau (*Carausius morosus*), esta enzima foi detectada no ducto salivar e associada a uma possível fonte de dopamina (Ali & Orchard, 1996a).

1.5 Saliva

Os triatomíneos são insetos hematófagos que obtêm o sangue diretamente dos vasos do hospedeiro vertebrado (Lavoipierre *et al.*, 1959). As mandíbulas perfuram a pele do hospedeiro e ancoram o aparato bucal, enquanto as maxilas realizam movimentos oscilatórios até penetrarem no vaso sanguíneo. Esta fase é chamada de fase de sondagem. Em seguida, tem início a fase de ingurgitamento, quando o inseto ingere o sangue do hospedeiro.

Soares e colaboradores (2006) mostraram, utilizando microscopia intravital, que a saliva é continuamente liberada durante todo o processo de alimentação (fases de sondagem e ingurgitamento). De acordo com os autores, a saliva é depositada dentro do vaso e parte dela é ingerida juntamente com o sangue.

A constante deposição de saliva e os movimentos das peças bucais no hospedeiro desencadeiam respostas fisiológicas de reparo, como agregação plaquetária, constrição do vaso lesado, coagulação sanguínea, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia dos leucócitos (Ribeiro, 1995). Neste contexto, a fim de permitir um repasto eficiente, a saliva apresenta várias substâncias que antagonizam os sistemas hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro vertebrado (Ribeiro & Francischetti, 2003).

A literatura tem mostrado várias substâncias que facilitam a localização dos vasos e a manutenção do fluxo sanguíneo, como anticoagulantes (Hellmann & Hawkins, 1964, 1965; Ribeiro *et al.*, 1995, 1998; Pereira *et al.*, 1996), anti-histamínicos (Ribeiro & Sarkis, 1982; Ribeiro & Walker, 1994), vasodilatores (Ribeiro *et al.*, 1990, 1993; Ribeiro & Nussenzeig, 1993; Yuda *et al.*, 1996), bloqueador de canal de sódio (Dan *et al.*, 1999), inibidores da agregação plaquetária induzida por colágeno (Ribeiro & Garcia, 1981; Noeske-Jungblut *et al.*, 1994), ADP (Ribeiro & Garcia, 1980; Sarkis *et al.*, 1986), ácido araquidônico (Ribeiro & Sarkis, 1982), trombina (Noeske-Jungblut *et al.*, 1995; Francischetti *et al.*, 2000) ou PAF (Golodne *et al.*, 2003). Também foram descritos compostos que auxiliam o processo de alimentação reduzindo a resposta imune e inflamatória do hospedeiro. Dentre eles, podem ser citadas substâncias imunossupressoras (Kalvachova *et al.*, 1999) e de atividade anti-complemento (Cavalcante *et al.*, 2003), uma sialidase (Amino *et al.*, 1998) e uma proteína formadora de poro (Amino *et al.*, 2002).

Em *R. prolixus*, as nitroforinas são as moléculas mais abundantes da saliva e constituem aproximadamente 50% das proteínas salivares. Nitroforinas são hemoproteínas que, por apresentarem um grupamento heme na sua molécula, conferem coloração avermelhada à glândula. Até o momento, sete nitroforinas foram descritas e denominadas de

NP1 a NP7 (Champagne *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 2003; Knipp *et al.*, 2007). As nitroforinas têm a habilidade de armazenar e transportar óxido nítrico (NO) (Ribeiro & Nussenzveig, 1993; Nussenzveig *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1998, 2005) e inibir a agregação plaquetária na microcirculação (Moncada *et al.*, 1991; Ribeiro *et al.*, 1995). Elas também apresentam atividade anti-histamínica (Ribeiro & Walker, 1994) e anticoagulante, atuando nas vias intrínseca (Zhang *et al.*, 1998) e extrínseca (Isawa *et al.*, 2000) da cascata de coagulação, atividade recentemente confirmada por Moreira e colaboradores (2003).

Com a utilização de RNAi, Araújo e colaboradores (2009) silenciaram quatro nitroforinas de ninfas de quarto estágio de *R. prolixus*. Quando comparado ao grupo controle, o grupo *knockout* apresentou menor ingestão de sangue, um maior tempo de sondagem e menor frequência da bomba cibarial. Esses dados reforçam a importância das nitroforinas na obtenção de um repasto eficiente.

Na saliva de *R. prolixus* também foi encontrada lisofosfatidilcolina (LPC), uma substância de efeito quimiostático (Golodne *et al.*, 2003). A pré-incubação de macrófagos peritoneais com saliva ou LPC aumentou cinco vezes a associação com *T. cruzi*, impedindo a produção de óxido nítrico. Além disso, a inoculação de saliva ou LPC na presença dos parasitas aumentou até seis vezes a parasitemia sanguínea em camundongos, indicando que o LPC aumenta a transmissão de *T. cruzi*. Apesar do parasita ser eliminado pelas fezes, esse estudo mostrou a importância da saliva na potencialização da parasitemia (Mesquita *et al.*, 2008).

1.6 Endossimbiontes dos triatomíneos

Bactérias fazem parte de uma íntima associação de simbiose com insetos de diferentes grupos taxonômicos (Douglas, 1989). Nos triatomíneos, dois grupos de bactérias simbiontes têm sido observados. O primeiro grupo compreende organismos observados no intestino (Wigglesworth, 1936; Goodchild, 1955) e são responsáveis pelo suplemento de vitamina B, essencial para sua sobrevivência (Baines, 1956; Lake & Friend, 1968). Neste caso, pode ser citado o *Rhodococcus rhodnii*, um actinomiceto nocardioforme que reside extracelularmente no lúmen intestinal de *R. prolixus* e é transmitido para a progênie por coprofagia (alimentação de fezes). Insetos que se desenvolveram na ausência dessa bactéria não alcançaram a maturação sexual quando adultos e a maioria morreu após a segunda muda. Quando a bactéria

foi inserida no primeiro ou segundo estágio, o desenvolvimento e a maturação do inseto foram normais (Baines, 1956; Harrington, 1960; Hill *et al.*, 1976).

O segundo grupo compreende bactérias Gram-negativas e foi primeiramente observado por Hypša (1993) em vários órgãos de *T. infestans*, como sistema nervoso, glândulas salivares, hemócitos, músculos viscerais, células do pericárdio, nefrócitos, ovário, testículo e vaso dorsal. De acordo com o Hypša (1993), trata-se de um endossimbionte intracelular que apresenta transmissão transovariana. Mesmo em infecções maciças, o autor não considerou a bactéria como patogênica ao triatomíneo (Hypša, 1993). Posteriormente, esse endossimbionte foi isolado da hemolinfa de *T. infestans* e cultivado na presença de células C6/36 em meio MM (Mitsubishi-Maramorosch) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Hypša & Dale, 1997). Os autores verificaram se tratar de uma bactéria Gram negativa, com células imóveis, não formadoras de esporos, sem flagelos, medindo cerca de 15µm de comprimento, que se dividiam por septação e apresentavam forma esférica a filamentosa. A análise do DNA ribossomal 16S e uma caracterização morfológica revelaram ser um membro do subgrupo γ -3 da classe Proteobacteria, apresentando 96,2% de similaridade com a bactéria *Arsenophonus nasoniae*. Assim, os autores sugeriram “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*” como um possível nome para esse endossimbionte (Hypša & Dale, 1997). Entretanto, a literatura apresenta escassa informação sobre a relação deste endossimbionte com os triatomíneos.

Atualmente, alguns estudos de paratransgenia têm sido realizados na tentativa de utilizar microrganismos para o controle da doença de Chagas (Beard *et al.*, 2002). Neste caso, a paratransgenia envolve o vetor da doença, os simbiossomas deste vetor e o agente etiológico. Os simbiossomas são isolados e modificados geneticamente *in vitro* para liberar moléculas que interfiram na transmissão do patógeno. Os simbiossomas transformados são então introduzidos no vetor, onde expressam essas moléculas, afetando a habilidade do vetor de transmitir o patógeno, ou seja, a sua competência. Neste contexto, um dos microrganismos mais estudados é o *R. rhodnii*, que ocupa o lúmen intestinal do *Rhodnius*. Portanto, está em contato direto com o *T. cruzi* e é considerado um candidato favorável aos estudos de paratransgenia. Beard e colaboradores (2001, 2002) inseriram em *R. rhodnii* um plasmídeo com o gene da cecropina A, um peptídeo anti-microbiano. Dentro do intestino de *R. prolixus*, a bactéria transformada passou a expressar a cecropina A, eliminando ou reduzindo a densidade do *T. cruzi* (Beard *et al.*, 2001, 2002). Além disso, os autores mostraram que essas bactérias transformadas foram adquiridas por coprofagia, produziram as vitaminas necessárias ao desenvolvimento do inseto

e persistiram ao longo de todo o ciclo de vida, assim como a bactéria selvagem (Durvasula *et al.*, 1999a, b).

Em *T. infestans*, um outro grupo de simbioses intestinais foi utilizado. Bactérias do gênero *Corynebacterium* foram submetidas à transformação genética e passaram a produzir fragmentos de anticorpos imunologicamente ativos. O fragmento apresenta atividade contra o *T. cruzi*. Dentro do intestino, as bactérias produziram os fragmentos de anticorpos e eliminaram ou reduziram a densidade do patógeno (Durvasula *et al.*, 2008).

Vários trabalhos mostram tentativas de paratransgenia no controle da Doença de Chagas (Beard *et al.*, 1998, 2001, 2002; Durvasula *et al.*, 1999a; Dotson *et al.*, 2003). Apesar das perspectivas para esse controle serem muito promissoras para a saúde pública, muitos estudos ainda precisam ser realizados, para que se conheçam seus riscos e benefícios. Trata-se de uma questão política, ambiental e de segurança pública (Beard *et al.*, 2001).

2 Justificativa

Tendo em vista a importância médico-sanitária dos triatomíneos, vetores do *T. cruzi* e do *T. rangeli*, e a importância da glândula salivar durante o repasto sanguíneo e na transmissão/potencialização da infecção dos parasitas, o estudo morfológico destes órgãos secretores torna-se importante para o conhecimento da sua anatomia, histologia e ultra-estrutura. O inseto é hematófago durante todo o ciclo de vida. Entretanto, o crescimento/desenvolvimento da glândula salivar ainda é desconhecido. Assim, o conhecimento da morfologia, aliado à investigação dos tipos de secreção e às estruturas musculares e neuronais que controlam a ejeção da saliva, contribuem para o melhor entendimento da fisiologia do complexo glandular e, conseqüentemente, do processo de hematofagia, essencial para a sobrevivência dos triatomíneos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar morfologicamente o desenvolvimento pós-embrionário da glândula salivar de *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans* (Hemiptera, Triatominae) e identificar a presença de bactérias na glândula salivar de *T. infestans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a morfologia geral das glândulas salivares utilizando técnicas histológicas convencionais;
- Conhecer a microanatomia das glândulas salivares e do epitélio secretor através da microscopia eletrônica de varredura;
- Caracterizar os tipos de secreções presentes nas glândulas salivares por meio das microscopias de luz e eletrônica de varredura;
- Reconhecer o desenvolvimento da glândula salivar nos diferentes estádios e estágios analisados, quantificando o número de células existentes com a utilização de marcadores fluorescentes nucleares;
- Evidenciar os elementos celulares que controlam e induzem a secreção da glândula salivar utilizando marcadores para células musculares e neuronais;
- Identificar a possível presença de bactérias na glândula salivar de *T. infestans*.

4 Metodologia

4.1 Triatomíneos

4.1.1 Manutenção dos insetos

Foram utilizados triatomíneos das espécies *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans* de colônias do Insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, pertencente ao Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR - FIOCRUZ). As colônias são provenientes de insetos capturados em Honduras (*R. prolixus*), Piracema (Minas Gerais, Brasil) (*P. megistus*) e Santivanez (Bolívia) (*T. infestans*).

No insetário, os insetos foram mantidos em potes fechados na parte superior com tecido de malha fina. Dentro do pote, um cilindro de cartolina com orifícios foi colocado, para servir como apoio, esconderijo e acesso para os insetos durante a alimentação. O insetário foi mantido à 26°C e 55% de umidade. Os insetos foram alimentados em galinhas imobilizadas ou em camundongos anestesiados semanalmente (*P. megistus* e *T. infestans*) ou quinzenalmente (*R. prolixus*).

4.1.2 Espécies utilizadas

Foram utilizados triatomíneos da espécie *R. prolixus* durante todo o ciclo de vida pós-embrionário, ou seja, ninfas de primeiro a quinto estágio e adulto (Figuras 1A-F), em jejum e alimentados. Foi padronizado o uso em adultos machos, pois trabalhos anteriores do grupo mostraram que a glândula salivar em machos e fêmeas é semelhante, apresentando apenas diferenças no número e quantidade de corpúsculos nucleolares e heterocromáticos (Anhê & Azeredo-Oliveira, 2008 [anexo 2]).

Como nossos dados não mostraram diferenças morfológicas na glândula salivar durante todo o ciclo de vida de *R. prolixus*, para *P. megistus* e *T. infestans*, apenas ninfas de primeiro estágio e adultos (Figuras 1G-J) tiveram a glândula analisada. Os estágios intermediários (ninfas de segundo a quinto estágios) não foram utilizados.

Os seguintes grupos de insetos foram utilizados:

- **Insetos durante jejum:** cinco dias após a eclosão para ninfas de primeiro estágio e sete dias após a ecdise para os demais estádios.

- **Insetos alimentados:** sete dias após a alimentação. Os insetos foram alimentados no quinto dia após eclosão (para ninfas de primeiro estágio) ou no sétimo dia após a ecdise (para os demais estádios). O repasto aconteceu apenas em camundongos anestesiados e foram selecionados os insetos que visualmente alimentaram-se da maior quantidade de sangue. Nesse grupo apenas *R. prolixus* foi utilizado.

- **Insetos estimulados a alimentar:** um camundongo anestesiado foi oferecido aos insetos. Os triatomíneos caminhavam em direção ao hospedeiro e, quando eles estendiam a rostro a fim de iniciar o repasto, eles eram imediatamente colocados sobre lâmina com PBS e dissecados. Nesse grupo apenas *R. prolixus* foi utilizado.

- **Insetos durante alimentação:** um camundongo anestesiado foi oferecido aos insetos e o repasto sanguíneo foi iniciado. Após alguns minutos, a alimentação foi interrompida e o inseto foi colocado sobre lâmina com PBS e dissecado.

Estes dois últimos grupos foram utilizados para os experimentos de imunomarcagem de células nervosas.

4.2 Dissecção e retirada das glândulas salivares

Triatomíneos da espécie *R. prolixus* (Figuras 1A-F) foram sedados pelo frio e colocados sobre lâmina contendo PBS. Com o auxílio de um estereoscópio e utilizando pinças de ponta fina, a cabeça do inseto foi removida delicadamente e a glândula salivar, juntamente com a porção anterior do sistema digestivo, foi exteriorizada. A seguir, utilizando estiletos, a glândula foi destacada da cabeça (Figuras 2A-B), lavada em PBS e fixada para a análise morfológica (item 4.4). Ninfas de primeiro estágio de *P. megistus* (Figura 1G) e *T. infestans* (Figura 1I) foram dissecadas da mesma forma e fixadas para análise morfológica (item 4.4).

Triatomíneos adultos das espécies *P. megistus* (Figura 1H) e *T. infestans* (Figura 1J) foram sedados pelo frio e colocados em placa de Petri contendo parafina sólida. Com a utilização de uma tesoura de ponta fina, patas e asas foram removidas, e as laterais do abdômen foram seccionadas. O dorso do inseto foi rebatido para frente e preso com um alfinete, expondo o interior do tórax e do abdômen do inseto. Sob o estereoscópio, observa-se a glândula salivar na região torácica, recoberta por uma rede fina e ramificada de traquéias e traquéolas. Com a utilização de pinça e estilete de ponta fina, a glândula e parte do esôfago

foram retirados e colocados sobre lâmina contendo PBS (Figuras 2C-F). A seguir, a glândula foi separada e fixada para análise morfológica (item 4.4) ou macerada em DNazol para amplificação por PCR (apenas glândula de *T. infestans*) (item 4.5).

4.3 Obtenção da saliva de *T. infestans*

Os insetos foram lavados em PBS e rapidamente em hipoclorito de sódio 1%. Em seguida, eles foram imobilizados entre os dedos de uma das mãos e com a outra mão foi realizada a estimulação mecânica em todo o seu corpo. A saliva liberada pela maxila foi coletada em um tubo capilar de vidro e transferida para uma lâmina (ambos estéreis). Esse procedimento aconteceu no interior de uma capela de fluxo laminar, para evitar contaminação por outras bactérias. A lâmina foi posteriormente fixada na chama do bico de Bunsen e submetida à coloração pelo método de Gram (item 4.4.1).

4.4 Processamento para microscopia

4.4.1 Microscopia de luz

As glândulas salivares foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 *overnight*. Em seguida, o material foi lavado três vezes em PBS, desidratado em concentrações crescentes de etanol, infiltrado em etanol-historesina por dez minutos e em Historesina (Jung Co) pura por 24h. No dia seguinte, o material foi transferido para historesina contendo endurecedor (15:1) e colocado em recipientes apropriados para polimerizar. Posteriormente, cortes semi-finos (1µm) obtidos com faca de vidro em micrótomo (Mícron - modelo HM 340 E), os quais foram colocados em lâminas e secos a 37°C em placa aquecedora. Para análise histológica, os cortes foram corados pelas seguintes técnicas: azul de Toluidina, PAS (*Periodic Acid Schiff*) e azul de bromofenol.

- **Azul de Toluidina:** as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo Azul de Toluidina (Sigma) (0,025g de azul / 100mL de água destilada) por quinze minutos, lavadas em água destilada, secas e montadas com Entellan ®. O azul de Toluidina, corante catiônico

(carregado positivamente), liga-se a substratos aniônicos (carregados negativamente) como os ácidos nucleicos (DNA e RNA). Trata-se de uma reação de basofilia.

- **PAS (*Periodic Acid Schiff*)**: as lâminas foram mergulhadas em ácido periódico 0,4% por 30 minutos, lavadas rapidamente em água destilada e colocadas no Reativo de Schiff por 1h30 no escuro. Em seguida, o material foi lavado três vezes em água sulfurosa e mergulhado em água corrente por 30 minutos. Após secagem, as lâminas foram montadas em Entellan ®. A técnica de PAS evidencia polissacarídeos neutros (Pearse, 1972)

- **Azul de Bromofenol**: as lâminas foram mergulhadas em solução de Mercúrio de Bromofenol (1-2% de cloreto de mercúrio, 0,05% de azul de bromofenol em ácido acético aquoso a 2%) por 2h15. Em seguida, o material foi lavado em ácido acético 0,5% por dez minutos e colocado em água corrente até a revelação da cor azul. Após secagem, as lâminas foram montadas em Entellan ®. Trata-se de uma técnica específica para proteínas totais (Pearse, 1972).

A lâmina da saliva *T. infestans* (item 4.3) foi fixada na chama do bico de Bunsen e submetida à coloração pelo método de Gram. A lâmina foi imersa no corante violeta genciana por 1 minuto, lavada em água destilada e fixada no lugol por 30 segundos. A seguir, o material foi lavado na solução de descoloração (1 álcool: 1 acetona) e imerso na fucsina (corante secundário) por 30 segundos. Após lavagem em água destilada e secagem, a lâmina foi analisada. Foi utilizado o kit da Renylab Química e Farmacêutica ®.

Trata-se de uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia de luz: Gram-negativas (que adquirem coloração púrpura) e Gram-positivas (que adquirem coloração azul).

As lâminas dos cortes histológicas e do esfregaço da saliva foram analisadas e fotografadas no microscópio Axio Observer Carl Zeiss, acoplado à câmera de alta resolução AxioCam MRc Ver.3 e analisador de Imagem Software Axiovision Release 4.8.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 *overnight*. No dia seguinte, o material foi lavado em PBS, pós fixado em solução de tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% por 2h, lavado novamente em PBS e submetido à desidratação em séries crescentes de acetona (30-100%). Em seguida, as amostras foram secas no aparelho de ponto crítico (Emitech K850), utilizando acetona e CO₂

líquido. Posteriormente, as amostras foram montadas em *stubs* sobre fitas de carbono, metalizadas com uma fina camada de ouro (metalizador Emitech K550) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (modelo JEOL 560 SEM). Algumas glândulas foram fraturadas após secagem no aparelho de ponto crítico, para expor o lúmen e permitir a análise do epitélio secretor.

4.4.3 Microscopia de fluorescência e *laser* confocal

O material foi fixado em formaldeído 4% por 2h a 4°C e lavado em PBS. Em seguida, as glândulas foram delicadamente transferidas para uma lâmina escavada, armazenada em câmara úmida. Posteriormente, o material foi incubado em RPMI por 2h e em solução de albumina bovina 1% (PBS/BSA) por 30 minutos para bloquear marcações inespecíficas. As glândulas de *T. infestans* e de *P. megistus* submetidas à imunomarcação contra células nervosas foram incubadas por 3h, pois 30 minutos não foi tempo suficiente para eliminar as marcações inespecíficas.

Em seguida, algumas amostras foram processadas para marcação nuclear e do citoesqueleto, enquanto outras foram processadas para imunomarcação, como descrito abaixo:

- **Marcação nuclear e do citoesqueleto:** o material foi incubado com faloidina-rodamina (*Molecular probes*, diluição 1:1000) por 24h, lavado em PBS, incubado em DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol, diluição 1:1000, Sigma) por 30 minutos, lavado novamente em PBS e montado entre lâmina e lamínula com Mowiol (Sigma). A faloidina (marcador de actina), por estar conjugada à rodamina, destaca em vermelho as células musculares e o citoesqueleto. O DAPI é um marcador nuclear específico, que evidencia os núcleos em azul. Para o controle da reação o material foi incubado apenas em PBS.

- **Imunomarcação com anticorpos contra neurotransmissores:** o material foi incubado por 24h com um dos seguintes anticorpos primários: anti serotonina, anti tirosina-hidroxilase e anti dopamina (Sigma). Os anticorpos foram diluídos 1:1000 em PBS/BSA 1%. No dia seguinte, ele foi lavado em PBS/BSA 1% três vezes e incubado no anticorpo secundário correspondente (anti-*rabbit*-FITC para serotonina e tirosina-hidroxilase; anti-*sheep*-FITC para dopamina). Os anticorpos secundários foram diluídos 1:100 no AC Dako (Dako Cytomation). Trata-se de um diluidor de anticorpo com componentes redutores de *background*. Após 2h, as glândulas foram lavadas em PBS e montadas entre lâmina e lamínula com Mowiol (Sigma). Os anticorpos secundários, por estarem conjugados a FITC,

destacam as fibras nervosas em verde. Para o controle da reação, o material foi incubado apenas com o anticorpo secundário.

Durante o processamento, o material foi protegido da luz, para evitar a perda de fluorescência. As lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio *laser* confocal e de fluorescência Axiovert 200M, Carl Zeiss, acoplado à câmera de alta resolução Axiocam HRc 12V DC e analisador de Imagem Software LSM-510. As marcações de faloidina-rodamina foram analisadas utilizando HBO ebq 100 ISOLATE, com filtros para rodamina e DAPI. As marcações de células nervosas foram analisadas utilizando o *laser* de íons argônio 488nm e filtro para leitura com comprimento de onda BP 505 - 530 para FITC.

4.5 Amplificação do gene universal bacteriano DNA ribossomal 16S

4.5.1 Extração do DNA

Lóbulos salivares de dez insetos foram submetidos à extração de DNA para amplificação por PCR. Os lóbulos anteriores e medianos (D1D2) foram depositados em um tubo tipo *ependorf* (DNA-free) e os posteriores (D3) em outro. Em seguida, o material foi submetido à extração do DNA utilizando o kit comercial DNAzol (DNAzol Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O material foi macerado em 300µL de DNAzol e centrifugado a 12000rpm por dois minutos para liberação do DNA. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual foi adicionado 200µL de etanol absoluto gelado para precipitação do DNA. Após nova centrifugação (12000rpm por quatro minutos), o sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado em 500µL de etanol 70% gelado e centrifugado novamente (12000rpm por quatro minutos). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Após secagem a temperatura ambiente, o DNA foi ressuscitado em água tratada com DEPC (Invitrogen®) e armazenado a -20°C.

A concentração do DNA foi estimada por leitura no Nanodrop®. Os seguintes valores foram obtidos: 11ng/µL (D1D2) e 69ng/µL (D3).

4.5.2 Amplificação por PCR

As reações de amplificação foram realizadas a partir das amostras de DNA dos lóbulos D1D2 e D3 utilizando iniciadores para os genes do DNA ribossomal bacteriano 16S. As amplificações foram realizadas em um termociclador automático (Eppendorf Mastercycler) em 35 ciclos (10 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 50°C para anelamento dos iniciadores, 3 minutos a 72°C para extensão dos fragmentos, seguidos por 25 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 50°C para anelamento dos iniciadores, 3 minutos a 72°C para extensão dos fragmentos). Os ciclos foram precedidos por um aquecimento inicial de 95°C por 2 minutos e seguidos por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C. Para finalizar, o sistema foi resfriado a 4°C. Os seguintes componentes foram adicionados a todas as reações: tampão 5x Green Go taq® Buffer (50,5µL de dNTPs, *primer* senso (0,75µL), *primer* antisenso R (0,75µL), Go taq® DNA Polymerase (0,2µL) e água para PCR (15,8µL), acrescidos do DNA extraído na etapa anterior (2µL de D3, 4µL de D1D2 e 2µL do controle positivo [DNA de cultura de bactérias intestinais de flebotomíneos]). No controle da reação (CR) foi adicionado 2µL de água para PCR.

Os *primers* utilizados apresentam a seguinte seqüência, de acordo com Polz e Cavanaugh (1998):

- 27 senso (5'-AGAGTTTGATC*_A/C_*TGGCTCAG)
- 1492 antisenso (5'-TACGG*_T/C_*TACCTTGTTACGACTT).

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. 10µL de cada produto amplificado foi colocado nas canaletas. Foi utilizado 6µL de marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA®). A eletroforese iniciou a 60V por dez minutos, seguido de 100V por 80 minutos. Em seguida, o gel foi imerso na solução fixadora (0,5% de ácido acético e 10% de álcool etílico em água tipo II) por dez minutos, solução de nitrato de prata 2% por 10 minutos e solução de NaOH 3% até a revelação das bandas. Em seguida, a revelação foi paralisada com a solução fixadora. O gel foi fotografado utilizando câmera fotográfica Canon PowerShot S3 IS.

5 Resultados

5.1 Observação das glândulas salivares ao estereoscópio

Foram analisadas as glândulas salivares dos triatomíneos *R. prolixus* (Figuras 1A-F), *P. megistus* (Figura 1G-H) e *T. infestans* (Figura 1I-J).

A glândula salivar se mostrou formada por dois lobos, cada um localizado nas laterais do esôfago, no tórax. Visualizado ao estereoscópio, cada lobo de *R. prolixus* é formado por um par de lóbulos, denominados de principal e acessório. O primeiro se apresentou maior, avermelhado e alongado e o segundo menor, esbranquiçado e arredondado. Nas ninfas de primeiro estágio, uma leve coloração avermelhada foi observada no lóbulo principal. Esta coloração se intensificou com o desenvolvimento (Figura 2A-B).

Nas espécies *P. megistus* (Figuras 2C-D) e *T. infestans* (Figuras 2E-F), a observação ao estereoscópio mostrou que cada lobo é formado por três lóbulos, denominados, de acordo com Barth (1954), de anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3). D1 apresentou-se amarelado e reniforme, D2 esbranquiçado e alongado e D3 oval e transparente.

5.2 Histologia das glândulas salivares

As colorações mostram os aspectos histológicos da glândula salivar dos triatomíneos estudados (*R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans*).

5.2.1 *R. prolixus*

Os resultados evidenciaram que, durante todo o ciclo de vida de *R. prolixus*, a glândula salivar se apresentou morfologicamente semelhante, sendo formada pelas mesmas estruturas: lóbulos principal e o acessório. Um par de ductos, também denominados de principal e acessório, tem origem de cada lóbulo. Além disso, foi observado que um epitélio simples de células glandulares reveste cada lóbulo e delimita o lúmen, onde a saliva é armazenada (Figura 3). Os lóbulos se mostraram envolvidos por fibras musculares (Figuras 3C, F). De cada um dos lóbulos surgia um canal para liberação da saliva. Ambos se juntavam em um canal único (hilo), e, posteriormente, ramificavam-se e formavam os ductos principal e acessório (Figura 3B).

A técnica de coloração por azul de Toluidina, que evidencia complexos de DNA/proteínas e RNA/proteínas, mostrou detalhes das células glandulares (Figuras 3B-C, E-F). O epitélio do lóbulo principal apresentou células maiores e binucleadas, com núcleos grandes e volumosos e grande área nucleolar (Figuras 3C, F). No lóbulo acessório foram evidenciadas células menores com núcleos pequenos e arredondados e menor quantidade de nucléolos (Figuras 3B, E). O restante do núcleo mostrou uma coloração fraca, característica da presença de eucromatina. O citoplasma se apresentou metacromático. No ducto, também foi observado um epitélio simples de células pequenas e arredondadas, núcleos pequenos e com nucléolo pouco desenvolvido (Figuras 3B, E).

Vesículas esféricas e não coradas foram observadas durante secreção para o lúmen do lóbulo principal (Figuras 3B, C; 5). Elas estavam entremeadas a uma região mais fracamente corada, correspondente às dobras de membrana (claramente visualizadas com a utilização de microscopia eletrônica) (Figuras 14D).

Em detalhe, a coloração com Azul de Toluidina mostrou a presença de nucléolos grandes e poucos em ninfas de primeiro e segundo estádios (Figuras 4A-E) e muitos corpúsculos nucleolares pequenos nos outros estádios analisados (Figuras 4F-L).

A técnica de azul de Toluidina também permitiu a observação de células durante intensa atividade de secreção. Vesículas arredondadas e não coradas foram visualizadas no citoplasma ou durante secreção para o lúmen (Figura 5). Em insetos adultos também foram observadas células se desprendendo do epitélio e soltas no lúmen (Figuras 5C-H). Parte destas células apresentavam morfologia semelhante às células epiteliais (Figura 5D-F), enquanto outras estavam intensamente coradas e com os núcleos condensados, características de célula apoptótica (Figuras 5C, G-H).

A coloração pelo PAS (Figuras 6A-D), teste específico para polissacarídeos neutros, mostrou uma coloração mais intensa no lúmen do lóbulo principal quando comparado ao acessório (Figuras 6A-C). Não foram observadas diferenças de coloração entre as regiões do lóbulo principal (Figura 6A). Resultado semelhante foi observado pelo azul de Bromofenol, específico para proteínas totais (Figuras 6E-H), e pela coloração de azul de Toluidina (Figura 3). No ducto, foram visualizadas dobras de membrana e uma secreção levemente corada pelo PAS (Figura 6D).

5.2.2 *P. megistus* e *T. infestans*

A análise das lâminas mostrou que os lóbulos (anterior, mediano e posterior) são formados por um epitélio simples de células glandulares que delimita o lúmen, onde a saliva é armazenada (Figuras 7 e 8). Em D1 (Figuras 7A-C, 8A-C) e D2 (Figuras 7D-F, 8-F) observou-se um revestimento por duas camadas de fibras musculares e traquéias. Em D3, apenas traquéias foram observadas (Figuras 7G-I, 8G-I).

A técnica de coloração com azul de Toluidina mostrou a presença de células binucleadas em D1 e D2, com núcleos arredondados e volumosos (Figuras 7A-F, 8A-F). Apresentaram grande área nucleolar, representada por nucléolos grandes e únicos (D2 de *P. megistus*) ou menores e numerosos (D1 de *P. megistus* e D1D2 de *T. infestans*) (Figuras 7C, F; 8C, F). Em D3, as células apresentaram núcleos com formatos irregulares, com menor área nucleolar e o epitélio apresentou-se mais delgado (Figuras 7G-I, 8G-I). O citoplasma se mostrou fortemente metacromático em D1 (Figuras 7B-C, 8B-C) e D2 (Figuras 7E-F, 8E-F) e fracamente corado em D3 (Figuras 7H-I, 8H-I).

Vesículas esféricas e não coradas foram observadas durante secreção para o lúmen. Elas foram observadas com maior frequência em D1 (Figuras 7B-C, 8B-C). D3 não apresentou vesículas (Figuras 7H-I, 8H-I). Dobras de membrana foram evidenciadas como uma região fracamente corada (visualizadas pela microscopia eletrônica – Figura 17) e foram mais evidentes em D3 (Figuras 7H-I, 8H-I).

No lóbulo posterior de *T. infestans* foram observadas bactérias de formato esférico e filamentosas (Figuras 8H, 9). Elas estavam dentro das células ou no lúmen em contato com a porção apical das células epiteliais (Figuras 9A-C). Poucas foram observadas soltas no lúmen (Figuras 9A). A saliva de alguns insetos foi extraída e corada pelo método de Gram (Figura 9D). Os resultados mostraram que bactérias Gram-negativas esféricas e filamentosas (coloração rosa) e bactérias Gram-positivas esféricas (coloração azul) foram liberadas durante a salivagem (Figura 9D). Bactérias não foram visualizadas nos outros dois lóbulos de *T. infestans* (Figuras 8A-F) e nem na glândula de *P. megistus* (Figura 7).

O teste do PAS (Figuras 12A-F, 13A-F) apresentou, em ambas as espécies, uma coloração mais intensa no lúmen do lóbulo anterior em relação ao lóbulo mediano (Figuras 12A-C, 13A-D). Nenhuma coloração foi visualizada no lúmen do lóbulo posterior (Figuras 12D-F, 13E-F).

A coloração pelo Azul de Bromofenol mostrou uma coloração mais intensa no lúmen do lóbulo anterior de *P. megistus* (Figuras 10G-I) e no mediano de *T. infestans* (Figuras 11G-

J). O lóbulo posterior não apresentou coloração em ambas as espécies (Figuras 10J-L, 11K-L). O hilo pode ser observado na Figura 10B.

5.3 Microanatomia da superfície e do epitélio secretor das glândulas salivares

A microscopia eletrônica de varredura permitiu uma análise detalhada da microanatomia da superfície e do epitélio secretor das glândulas salivares dos triatomíneos estudados.

5.3.1 *R. prolixus*

A glândula salivar de *R. prolixus* durante todo o ciclo do inseto foi analisada. Foram utilizados insetos em jejum e alimentados. Em ninfas de primeiro estágio, o lóbulo principal mediu cerca de 300µm, atingindo 1200µm quando adulto (Tabela 1). O lóbulo acessório mediu aproximadamente 10% do tamanho do lóbulo principal (cerca de 30µm em ninfas de primeiro estágio e 150µm em adultos) (Figura 12). As medidas foram realizadas em triplicata e os números médios estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Medidas do comprimento do lóbulo principal (LP) de ninfas (N) e adulto (Ad) de *R. prolixus* em jejum (J) e alimentado (A).

Estágio	Comprimento do LP (µm) ± desvio padrão
N1 J	299,2 ± 36,6
N1 A	429,7 ± 9,2
N2 J	473,2 ± 58,6
N2 A	617,5 ± 16,4
N3 J	658,0 ± 34,8
N3 A	764,7 ± 45,4
N4 J	851,8 ± 69,3
N4 A	886,7 ± 34,2
N5 J	1081,7 ± 59,9
N5 A	1123,3 ± 99,6
Ad J	1205,0 ± 96,6
Ad A	1203,0 ± 60,6

O lóbulo principal apresentou-se alongado e na sua região mediana lóbulo acessório e o par de ductos foram observados (Figura 12). Fibras musculares transversais foram visualizadas envolvendo lóbulos e ductos (Figuras 13A-D). Junto a essas fibras, muitas traquéias e traquéolas ramificadas (Figura 13A) e fibras nervosas (Figura 13G-L) foram observadas. O lóbulo acessório apresentou formato arredondado e algumas algumas projeções

uniam esse lóbulo ao principal (Figura 13B). O ducto principal apresentou maior calibre e da sua base tem início o ducto acessório (Figura 13D). Um canal anelado foi observado no interior dos ductos. Esse canal se mostrou único na base e se ramificou em dois em direção aos ductos (Figuras 13E-F). Sobre os ductos foram visualizadas traquéias e fibras nervosas ramificadas que seguiam em direção ao lóbulo acessório e, posteriormente, ao principal (Figuras 13G-I). Traquéias e nervos também foram visualizados chegando ao lóbulo principal pela região posterior (Figuras 13J-K), oriundas do esôfago.

Alguns lóbulos de ninfas de quinto estágio (jejum) foram fraturados, para visualização do epitélio secretor (Figura 14). Ele se mostrou composto por células secretoras com formato regular, principalmente hexagonais e medindo cerca de 40µm (Figuras 14A-C). Na superfície apical dessas células, dobras de membrana foram observadas e, entremeadas a elas, muitas vesículas de secreção foram visualizadas (Figuras 14C-E). Essas vesículas secretoras apresentavam cerca de 2µm e a maioria estava aberta e com pequenas vesículas no seu interior (Figuras 14D). Vesículas pequenas e semelhantes a essas foram visualizadas no citoplasma das células glandulares (Figura 14F) ou em aglomerados fora da glândula (Figura 14G). No ducto, também foi observado um revestimento interno de dobras de membrana semelhantes às do lóbulo (Figura 14H).

5.3.2 *P. megistus* e *T. infestans*

Glândulas salivares de ninfas de primeiro estágio e adultos (ambos em jejum) das duas espécies foram analisadas. Os dados mostraram que as glândulas das ninfas (Figuras 15I-J; 16I-J) e dos adultos (Figuras 15A-H; 16A-H) são formadas pelas mesmas estruturas: lóbulos anterior, mediano e posterior. As medidas dos comprimentos dos lóbulos foram realizadas em triplicatas e são apresentadas nas Tabelas 2 (*P. megistus*) e 3 (*T. infestans*). De acordo com o estado nutricional do inseto, D3 sofre muitas variações de comprimento (mesmo padronizando a utilização de insetos em jejum sete dias após a ecdise), o que pode ser observado pelo elevado desvio padrão (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Medidas do comprimento dos lóbulos anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de *P. megistus*.

Estágio	Comprimento dos lóbulos (µm) ± desvio padrão		
	D1	D2	D3
N1 J	206,7 ± 7,6	144,3 ± 5,1	189,2 ± 14,5
Ad J	714,7 ± 60,4	494,0 ± 9,5	802,6 ± 100,1

Tabela 3 - Medidas do comprimento dos lóbulos anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de *T. infestans*.

Estágio	Comprimento dos lóbulos (μm) \pm desvio padrão		
	D1	D2	D3
N1 J	205,7 \pm 13,6	244,3 \pm 6,7	206,8 \pm 14,5
Ad J	564,4 \pm 53,9	988,6 \pm 69,6	910,4 \pm 114,1

O formato dos lóbulos diferiu entre as espécies. Em *P. megistus*, D1 apresentou aspecto reniforme, D2 se mostrou alongado e D3 arredondado, onde D1 se apresentou maior que D2 (Figuras 15A, G, I-J). Em *T. infestans*, D1 se apresentou arredondado, D2 alongado e D3 formato oval. Nesta espécie, D2 se mostrou maior que D1 (Figuras 16A, G, I-J).

Todos os lóbulos estavam localizados no tórax, lateralmente ao esôfago: o par D1D2 na porção inicial e o par D3 na final. Foram observadas traquéias e nervos que partiam do esôfago e seguiam em direção aos lóbulos (Figuras 15, 16G).

Os resultados mostraram que D1 e D2 são revestidos por duas camadas de fibras musculares, traquéias e fibras nervosas e são unidos pela região mediana (Figuras 15A-D, 16A-E). Em D3, algumas fibras musculares (Figuras 15G-H, 16G) e nervosas (Figura 16H) foram observadas. Observou-se em D3 uma rede ramificada de traquéias maior que D1 e D2 (Figuras 15G-H, 16G).

Dois canais foram observados em D1 e D2: o canal salivar, que leva a saliva até a região da cabeça, e o canal secundário, que traz a secreção de D3 (Figuras 15E-F). O canal secundário apresentou menor calibre. Em detalhe, um nervo e uma traquéia podem ser observados acompanhando paralelamente os canais (Figura 15F).

Alguns lóbulos foram fraturados para análise do epitélio secretor. D1, D2 e D3 apresentaram dobras de membrana na região apical das células (Figura 17). Apenas no lóbulo posterior de *T. infestans*, bactérias de formato esférico e filamentosas foram observadas aderidas ao epitélio (o que reforçou os resultados obtidos na microscopia de luz) (Figuras 17E-H). Vale ressaltar que não foram observadas bactérias nos outros lóbulos (D1 e D2) (Figuras 17A-B), em D3 de ninfas de primeiro estágio desta espécie (Figura 17C) e em D3 de *P. megistus* (Figuras 17I-J).

5.4 Marcação nuclear e do citoesqueleto das glândulas salivares

A faloidina é um marcador de actina presente, por exemplo, no citoesqueleto e é capaz de definir com precisão as fibras musculares. Quando a faloidina está conjugada a rodamina,

tais estruturas são evidenciadas em vermelho. O DAPI é um marcador nuclear, específico para DNA, de coloração azulada.

A marcação com faloidina-rodamina permitiu a observação detalhada do revestimento muscular da glândula de *R. prolixus* (Figura 18), *P. megistus* (Figura 21) e *T. infestans* (Figura 22). Todos os lóbulos e ductos se apresentaram revestidos por fibras musculares, formadas por filamentos paralelos de actina (Figuras 20A-D, 23A-F).

Com exceção de D3, o revestimento muscular foi observado cobrindo todo o lóbulo (Figuras 20A-B, 23A-B, D-E). Em D3, apenas algumas fibras musculares ramificadas foram visualizadas, sem revestir todo o órgão (Figuras 23C, F).

Esse revestimento muscular foi observado desde o nascimento do inseto (ninfas de primeiro estágio) até a forma adulta (Figuras 18, 21, 22). A ausência de marcação específica no controle comprovou a veracidade da marcação (Figuras 20E-F, 23G-J).

A análise da marcação com DAPI mostrou a presença de células binucleadas durante todo o ciclo de vida nas três espécies estudadas (Figuras 19, 21 e 22). Núcleos grandes e volumosos foram observados no lóbulo principal (*R. prolixus*) (Figuras 20A, C) e anterior e mediano (*P. megistus* e *T. infestans*) (Figuras 23A-B, D-E). Os núcleos apresentaram formato alongado (lóbulo principal e mediano) ou arredondado (lóbulo acessório e anterior).

O número de células dos lóbulos principal (*R. prolixus* [Tabela 4]) e anterior e mediano (*P. megistus* [Tabela 5] e *T. infestans* [Tabela 6]) foi contado e analisado. A contagem foi realizada em triplicata e as Tabelas apresentam os números médios e os desvios padrão.

Como pode ser observado na Tabela 4, durante todo o desenvolvimento, os estágios de *R. prolixus* apresentaram um número médio de 470 células \pm 18. Foi realizada uma análise de variância entre as medidas e não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Contagem do número de células do lóbulo principal nos estágios de ninfa (N) e adulto (Ad) de *R. prolixus* em jejum (J) e alimentado (A)

Estágio	Número de células \pm desvio padrão	
	D1	D2
N1 J	459 \pm 14	
N1 A	460 \pm 12	
N2 J	460 \pm 20	
N2 A	433 \pm 15	
N3 J	499 \pm 18	
N3 A	444 \pm 21	
N4 J	468 \pm 23	
N4 A	453 \pm 14	
N5 J	482 \pm 28	
N5 A	478 \pm 15	
Ad J	501 \pm 20	
Ad A	491 \pm 18	
Média	469 \pm 18	

Em *P. megistus*, ninfas de primeiro estágio e adultos apresentaram um número médio de 647 ± 25 células em D1 e 205 ± 10 em D2 (Tabela 5). Em *T. infestans*, os valores médios foram 502 ± 11 em D1 e 487 ± 7 em D2 (Tabela 6).

Considerando os valores de desvio padrão e as médias obtidas, não se observou diferença entre o número médio de células dos lóbulos de ninfas de primeiro estágio e adultos, ou seja, o número de células de cada lóbulo não se alterou com o crescimento do inseto.

Tabela 5 - Contagem do número de células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de *P. megistus*.

Estágio	Número de células \pm desvio padrão	
	D1	D2
N1 J	650 \pm 14	213 \pm 10
Ad J	647 \pm 25	205 \pm 10
Média	647 \pm 25	205 \pm 10

Tabela 6 - Contagem do número de células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de *T. infestans*

Estágio	Número de células \pm desvio padrão	
	D1	D2
N1 J	496 \pm 6	483 \pm 7
Ad J	502 \pm 11	487 \pm 7
Média	502 \pm 11	487 \pm 7

A análise dos núcleos incubados com DAPI (Figuras 19, 21B, E, H, K; 22B, E, H, K) também possibilitou o cálculo da área nuclear. As medidas foram realizadas com a utilização

do programa LSM Zeiss 510. Os dados são apresentados nas Tabelas 7 (*R. prolixus*), 8 (*P. megistus*) e 9 (*T. infestans*).

Tabela 7 - Medidas das áreas nucleares das células do lóbulo principal nos estágios de ninfa (N) e adulto (Ad) de *R. prolixus* em jejum (J) e alimentado (A)

Estágio	Área nuclear (μm^2) \pm desvio padrão
N1 J	30,88 \pm 1,44
N1 A	45,39 \pm 3,33
N2 J	89,58 \pm 3,28
N2 A	93,52 \pm 2,84
N3 J	130,72 \pm 8,21
N3 A	142,41 \pm 33,54
N4 J	222,51 \pm 27,71
N4 A	430,47 \pm 72,93
N5 J	786,04 \pm 76,36
N5 A	829,28 \pm 41,91
Ad J	1211,32 \pm 43,38
Ad A	1282,63 \pm 17,82

Tabela 8 - Medidas das áreas nucleares das células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de *P. megistus*.

Estágio	Área nuclear (μm^2) \pm desvio padrão	
	D1	D2
N1 J	37,08 \pm 1,60	27,00 \pm 0,30
Ad J	466,66 \pm 6,84	769,14 \pm 11,17

Tabela 9 - Medidas das áreas nucleares das células dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2) de ninfa (N) e adulto (Ad) em jejum (J) de *T. infestans*.

Estágio	Área nuclear (μm^2) \pm desvio padrão	
	D1	D2
N1 J	32,71 \pm 1,45	28,69 \pm 1,33
Ad J	565,15 \pm 48,36	486,25 \pm 35,74

5.5 Imunomarcção das fibras nervosas presentes nas glândulas salivares

A imunomarcção de substâncias específicas contra células nervosas permitiu a observação de aspectos da inervação da glândula salivar de insetos em jejum, estimulados a alimentar (apenas em *R. prolixus*) e durante alimentação. Foram utilizados anticorpos contra serotonina, tirosina-hidroxilase e dopamina.

5.5.1 *R. prolixus*

Insetos em jejum apresentaram atividade serotoninérgica apenas nos ductos (Figuras

24I-J). O anticorpo marcou fortemente os ductos, na forma de marcações pontuais ou lineares distribuídas ao longo de toda a sua extensão (Figura 24J).

Glândulas de insetos estimulados a alimentar apresentaram atividade serotoninérgica no lóbulo principal (Figuras 24A-D). A marcação linear se estendeu por todo o lóbulo, ramificando a partir da região mediana (Figuras 24B-C). Marcação mais intensa foi observada no ducto (Figura 24D). Essa atividade no lóbulo se intensificou quando o inseto iniciou o repasto, como observado em insetos durante alimentação (Figuras 24E-H). Todo o lóbulo apresentou-se fortemente marcado (Figuras 24F-G). O ducto continuou mostrando intensa marcação em toda a sua extensão (Figura 24H).

Algumas glândulas desses insetos foram incubadas com anti-serotonina e faloidina/rodamina (Figura 25). No lóbulo principal (Figuras 25A, C, E) e no ducto (Figuras 25B, D, F), fibras nervosas lineares foram observadas acompanhando as fibras musculares.

Atividade de tirosina-hidroxilase não foi observada em insetos em jejum (Figura 26E). A enzima se mostrou ativa apenas em insetos durante alimentação, quando a região mediana do lóbulo principal, o lóbulo acessório e o ducto se apresentaram fortemente marcados (Figuras 26A-C). Também foi destacada uma fibra nervosa que alcançava o lóbulo acessório e se ramificava pelo principal (Figura 26D) (previamente visualizada na microscopia eletrônica de varredura – Figura 13G).

Atividade dopaminérgica foi visualizada apenas em insetos durante alimentação. Nesses insetos, o ducto apresentou marcação na formação de numerosos pontos e algumas linhas delgadas (Figuras 27A-B). Em jejum, nenhuma atividade foi observada (Figura 27C).

Em todos os experimentos, o grupo controle foi realizado (incubação apenas com o anticorpo secundário). Apenas uma marcação inespecífica foi observada (auto-fluorescência), comprovando a veracidade dos resultados observados (Figuras 24K-L, 26F, 27D).

5.5.2 *P. megistus* e *T. infestans*

Em *P. megistus* durante jejum (Figuras 28A-F), atividade serotoninérgica foi observada em D1 e D3. D1 apresentou uma marcação linear que se ramificava da região mediana em direção a todo o lóbulo (Figuras 28A-B). O lóbulo posterior apresentou-se intensamente marcado, na forma de pequenos pontos espalhados por todo o lóbulo (Figura 28E) ou reunidos em grupos (Figura 28D). D2 não demonstrou atividade (Figura 28A).

Durante a alimentação, a atividade serotoninérgica se intensificou em D1 (Figuras 28G-H) e foi visualizada em D2 (Figura 28G). Os dois lóbulos mostraram marcações lineares e

ramificadas em toda a sua estrutura (Figuras 28G-H). D3 apresentou-se fortemente marcado em toda a sua estrutura, na forma de pontos agrupados ou marcações lineares (Figuras 28J-K). O canal secundário apresentou uma marcação linear (Figura 28J).

Em *T. infestans* jejum, atividade serotoninérgica foi observada em D1 e D3. Em D1, uma marcação linear se ramificava a partir região anterior do lóbulo (Figuras 29A-B). Em D3, observou-se uma marcação pontuada em algumas regiões, na forma de pontos fortemente marcados (Figuras 29D-E).

Durante a alimentação, atividade serotoninérgica se intensificou em D1, na forma de ramificações que se estendiam por toda a região anterior (Figuras 29G-H). Estas ramificações alcançavam a região anterior de D2 e a região do hilo (Figura 29G). D3 apresentou marcações pontuadas em toda a sua estrutura (Figuras 29J-K).

Nos controles de *P. megistus* e *T. infestans* (material incubado apenas com o anticorpo secundário) foi observada ausência de marcação específica, comprovando a veracidade dos resultados apresentados (Figuras 28C, F, I, L; 29C, F, I, L).

Atividade de tirosina-hidroxilase (Figura 30) não foi observada em *P. megistus* (Figuras 30A-C) e *T. infestans* (Figuras 30D-F), em nenhum dos dois grupos utilizados (insetos em jejum [dados não apresentados] e durante alimentação [Figura 30]). As glândulas submetidas à imunomarcção (Figuras 30A-F) se apresentaram semelhantes ao grupo controle (Figuras 30G-J), no qual apenas a auto-fluorêscencia foi evidenciada. O mesmo foi observado para marcação com dopamina (dados não apresentados).

5.6 Amplificação do gene universal bacteriano DNA ribossomal 16S

Amostras dos lóbulos salivares de *T. infestans* foram submetidos à PCR para amplificação do fragmento de DNAr bacteriano 16S. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 6% e fotografado (Figura 31).

Como pode ser visualizado na foto do gel (Figura 31), a amplificação de D3 revelou um fragmento de 1500pb, correspondente ao gene bacteriano DNAr 16S. Este fragmento também foi revelado na amostra de cultura bacteriana (controle positivo). A amostra de D1D2 não apresentou nenhuma banda, assim como o controle da reação (CR).

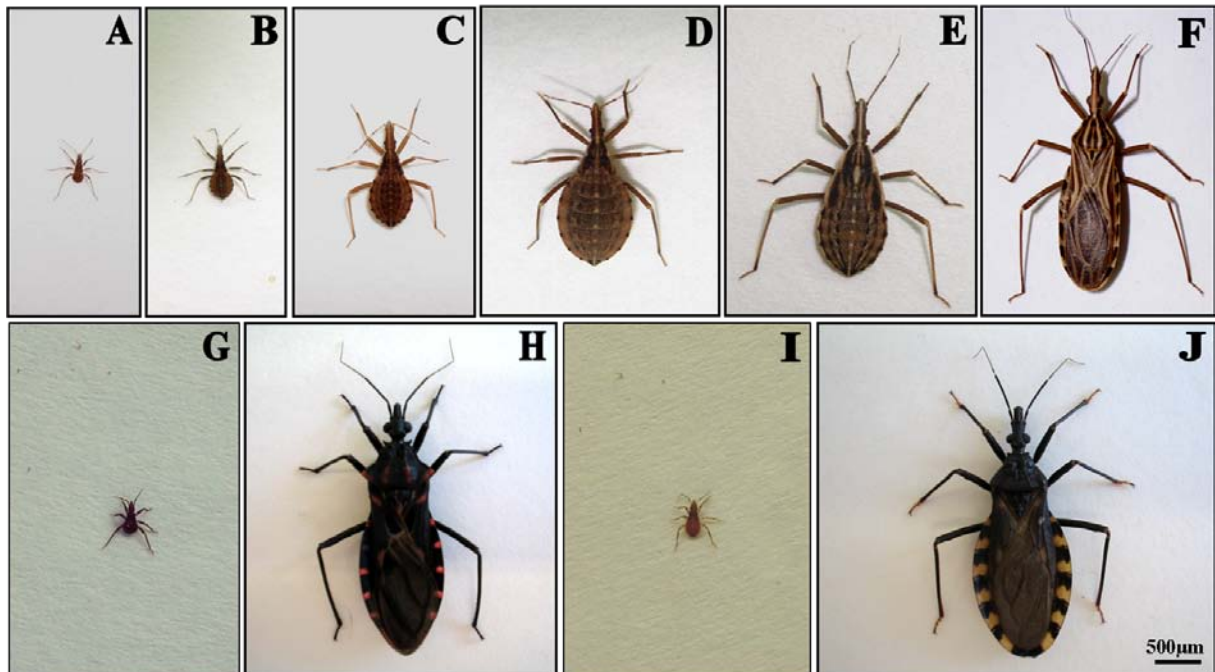


Figura 1 – Triatomíneos das espécies *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans*.

A-F) *R. prolixus*: cinco estádios ninfais (N) e adulto macho. **A)** N1; **B)** N2; **C)** N3; **D)** N4; **E)** N5; **F)** Adulto macho.

G-H) *P. megistus*: ninfa de primeiro estágio (**G**) e adulto macho (**H**).

I-J) *T. infestans*: ninfa de primeiro estágio (**I**) e adulto macho (**J**).

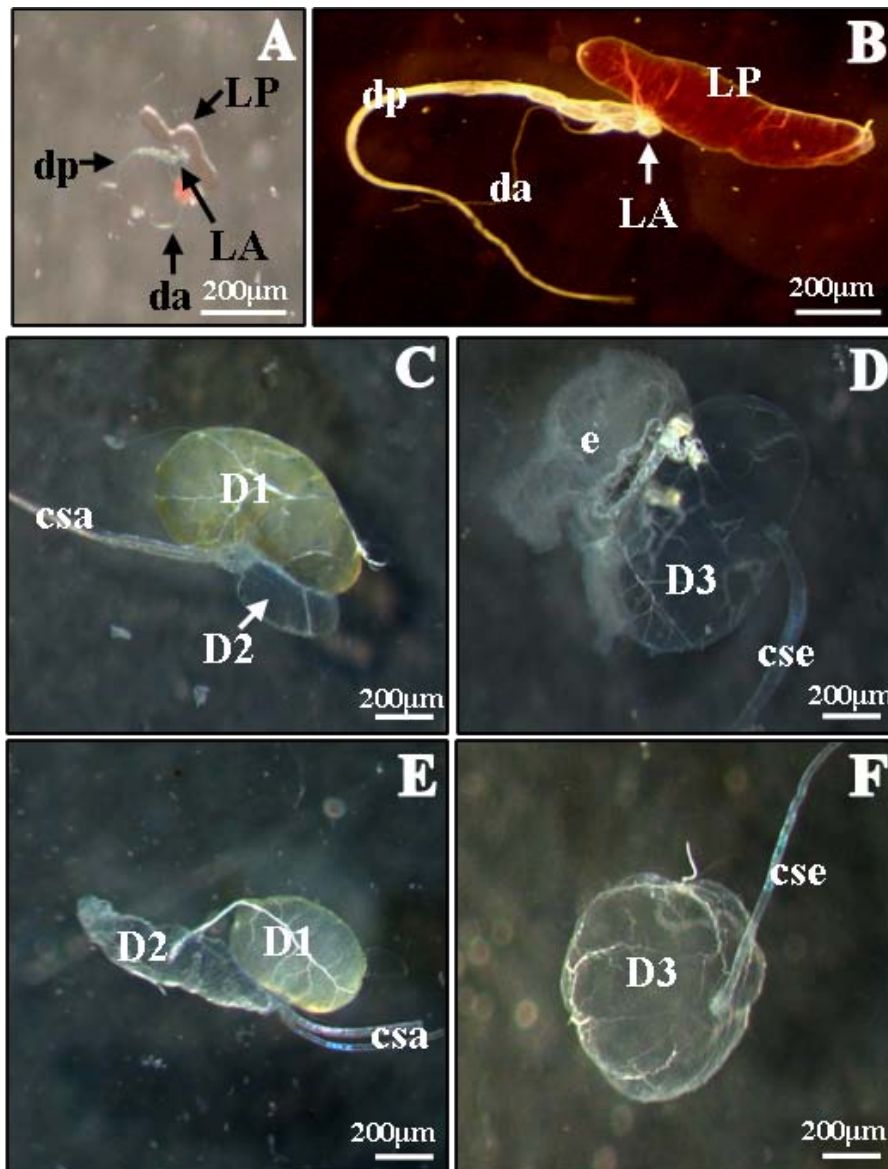


Figura 2 - Imagens estereoscópicas dos lóbulos salivares de *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans*.

A-B) *R. prolixus* (ninfa de primeiro estágio [A] e adulto [B]): Lóbulos principal (LP) e acessório (LA) e ductos principal (dp) e acessório (da). Observar a intensificação da coloração avermelhada com o desenvolvimento do inseto;

C-D) *P. megistus* (adulto macho): Lóbulos anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3) e canais salivar (csa) e secundário (cse).

E-F) *T. infestans* (adulto macho): Lóbulos anterior (D1), mediano (D2) e posterior (D3) e canais salivar (csa) e secundário (cse).

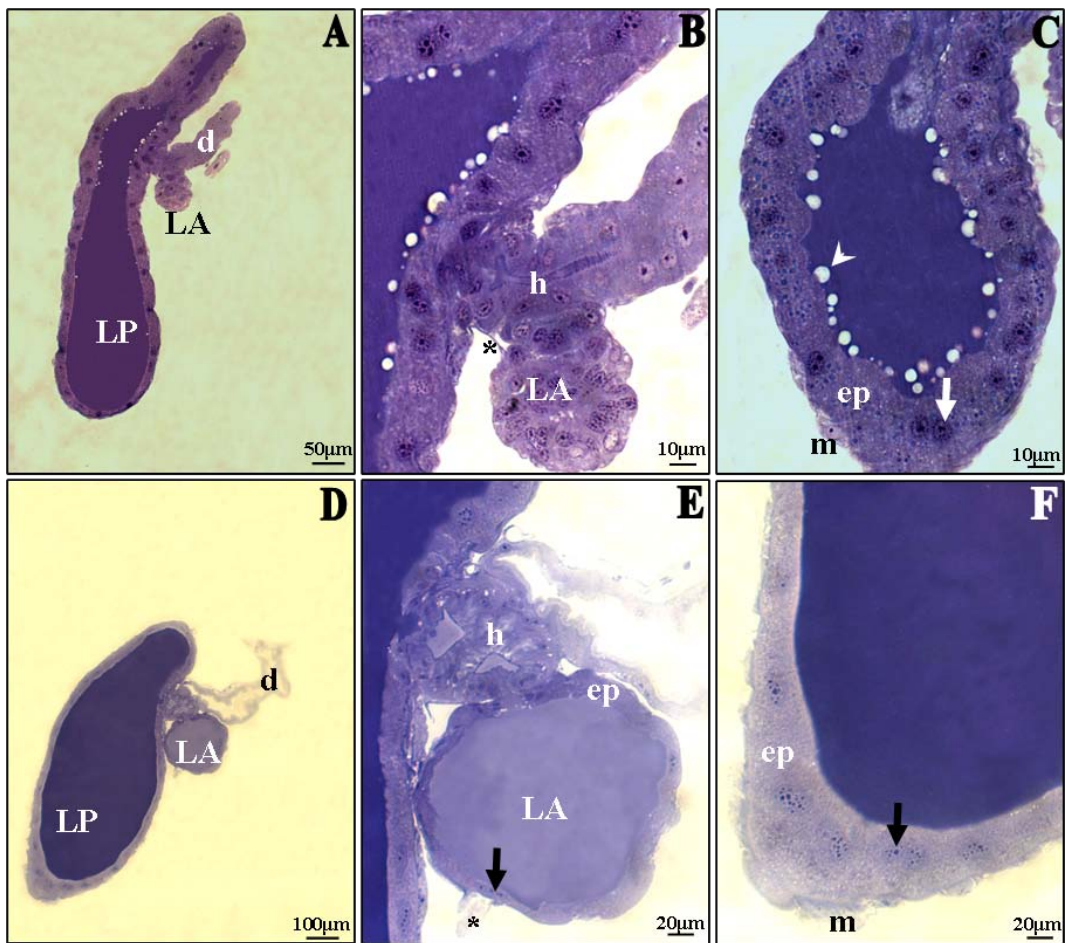


Figura 3 - Cortes histológicos dos lóbulos salivares de *R. prolixus* corados com Azul de Toluidina.

A, D) Visão geral do lobo salivar de ninfa de primeiro estágio jejum (**A**) e adulto alimentado (**D**), no qual se visualiza o lóbulo principal (LP), o acessório (LA) e o ducto (d);

B, E) Detalhes do lóbulo acessório (LA) de ninfa de primeiro estágio jejum (**B**) e adulto alimentado (**E**), formado por um epitélio simples (ep) de células glandulares. Observar a projeção (*) que liga o lóbulo acessório ao principal, o ducto (d) e o hilo (h). Os corpúsculos nucleolares são indicados pelas setas;

C, F) Detalhe do lóbulo principal de ninfa de primeiro estágio jejum (**C**) e adulto alimentado (**F**), formado por um epitélio glandular simples (ep) revestido por células musculares (m). As vesículas de secreção são indicadas pelas cabeças de seta e os corpúsculos nucleolares pelas setas.

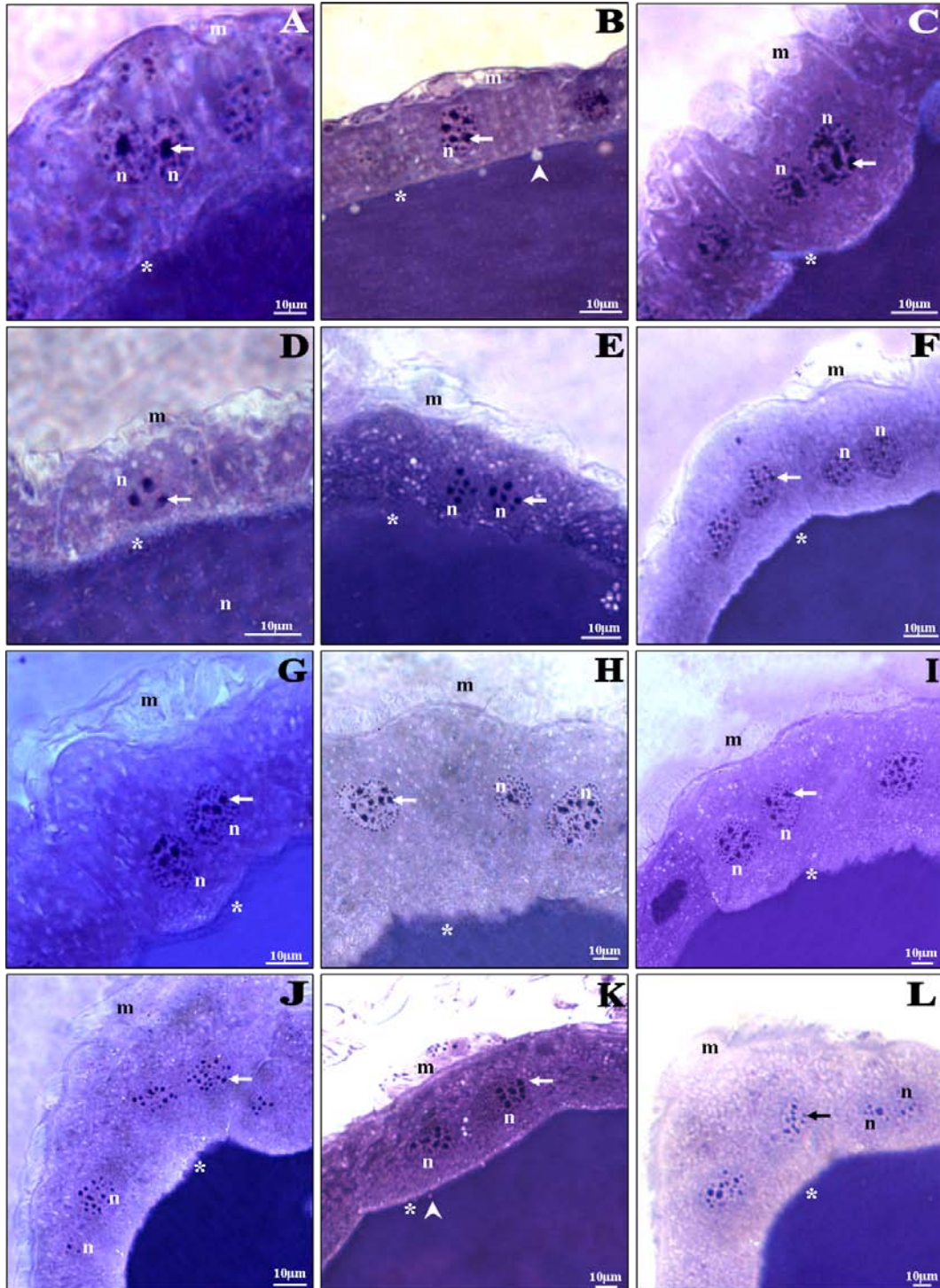


Figura 4 - Cortes histológicos do lóbulo principal de *R. prolixus* corados com Azul de Toluidina.

A) N1 jejum; **B)** N1 alimentada; **C)** N2 jejum; **D)** N2 alimentada; **E)** N3 jejum; **F)** N3 alimentada; **G)** N4 jejum; **H)** N4 alimentada; **I)** N5 jejum; **J)** N5 alimentada; **K)** Adulto jejum; **L)** Adulto alimentado. A letra “N” indica o estágio da ninfa. Observar os detalhes do epitélio do lóbulo principal, onde são visualizados os dois núcleos (n) de cada célula e os corpúsculos nucleolares (setas). O epitélio é revestido por fibras musculares e na região apical são observadas algumas vesículas de secreção (cabeças de seta) entremeadas às dobras de membrana (*). Observar a grande área nucleolar, representada por poucos nucléolos grandes nos primeiros estádios, que são substituídos por nucléolos pequenos e numerosos nos estádios finais e adultos.

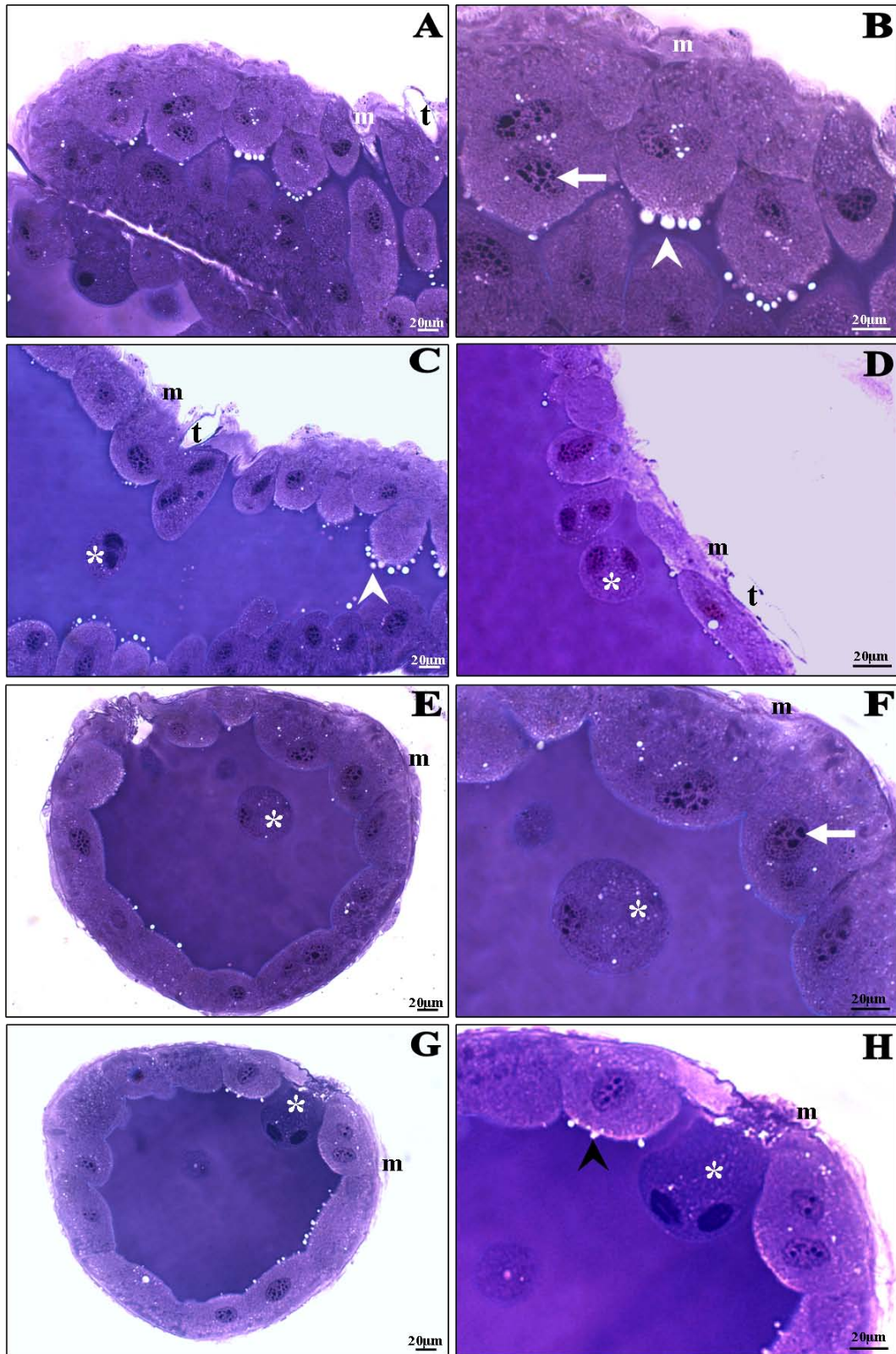


Figura 5 - Cortes histológicos do lóbulo principal de *R. prolixus* (adulto alimentado) corados com Azul de Toluidina.

Cortes longitudinais (**A-D**) e transversais (**E-H**) do lóbulo principal durante intensa atividade de secreção. Observar o grande número de vesículas de secreção (cabeça de seta) no citoplasma das células epiteliais ou durante secreção, característica de secreção apócrina. Em **C-H**, células inteiras são observadas no lúmen, indicativo de secreção do tipo holócrina (*). Em **G-H**, essas células apresentam características apoptóticas. Também são visualizados os corpúsculos nucleolares (setas), as fibras musculares (m) e traquéias (t).

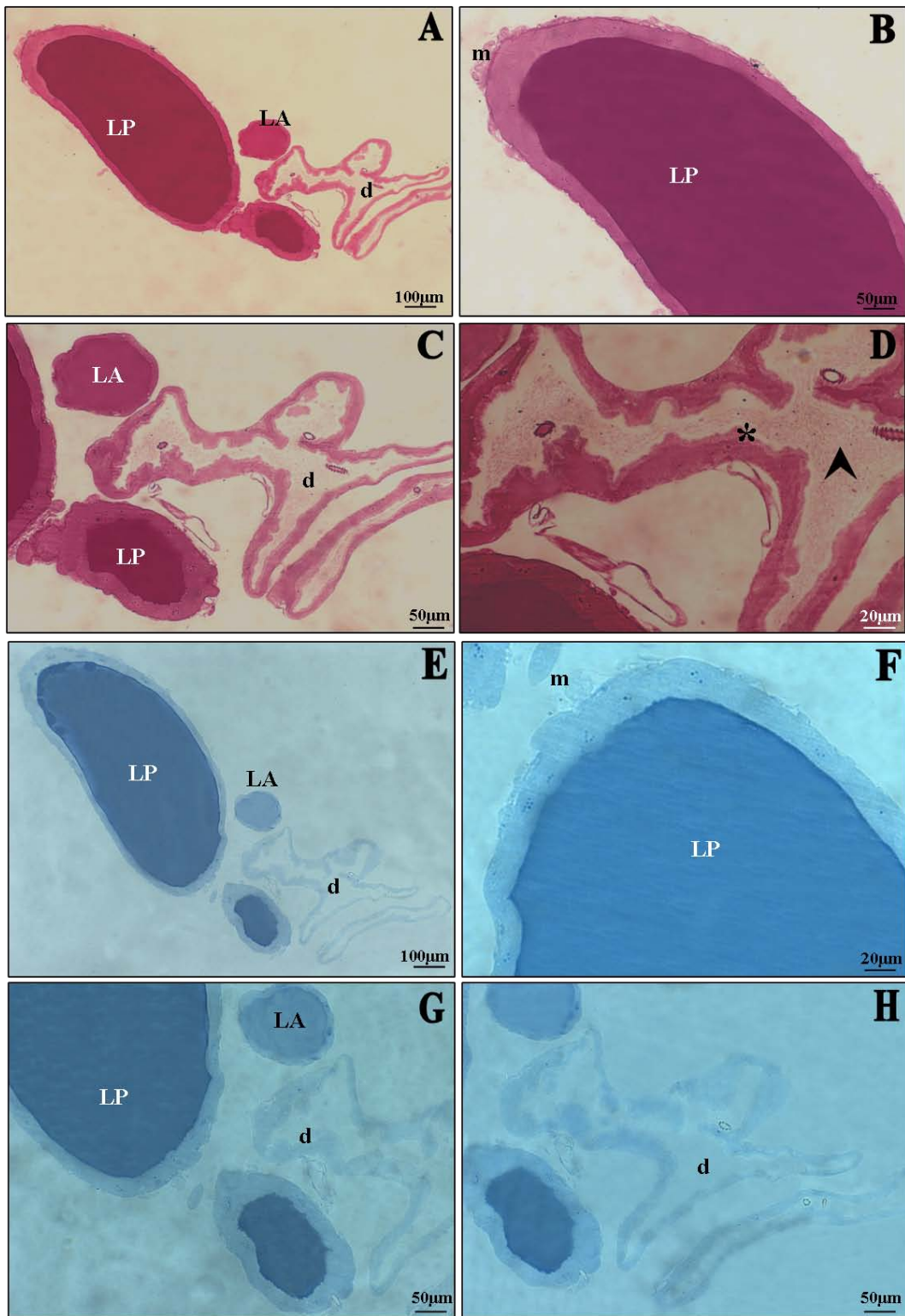


Figura 6 – Cortes histológicos dos lóbulos salivares de *R. prolixus* (adulto macho) corados pelo PAS (A-D) e pelo Azul de Bromofenol (E-H).

A, E) Visão geral dos lóbulos principal (LP), acessório (LA) e ducto (d). Observa-se uma coloração mais intensa no lóbulo principal;

B, F) Detalhe do lóbulo principal (LP);

C, G) Detalhe do lóbulo acessório (LA), que apresenta uma coloração menos intensa que o lóbulo principal (LP). O ducto (d) também é visualizado;

D, H) Detalhe do ducto. Em **D**, observa-se as dobras de membrana (*) e a presença de secreção (cabeça-de-seta) fracamente corada no seu interior.

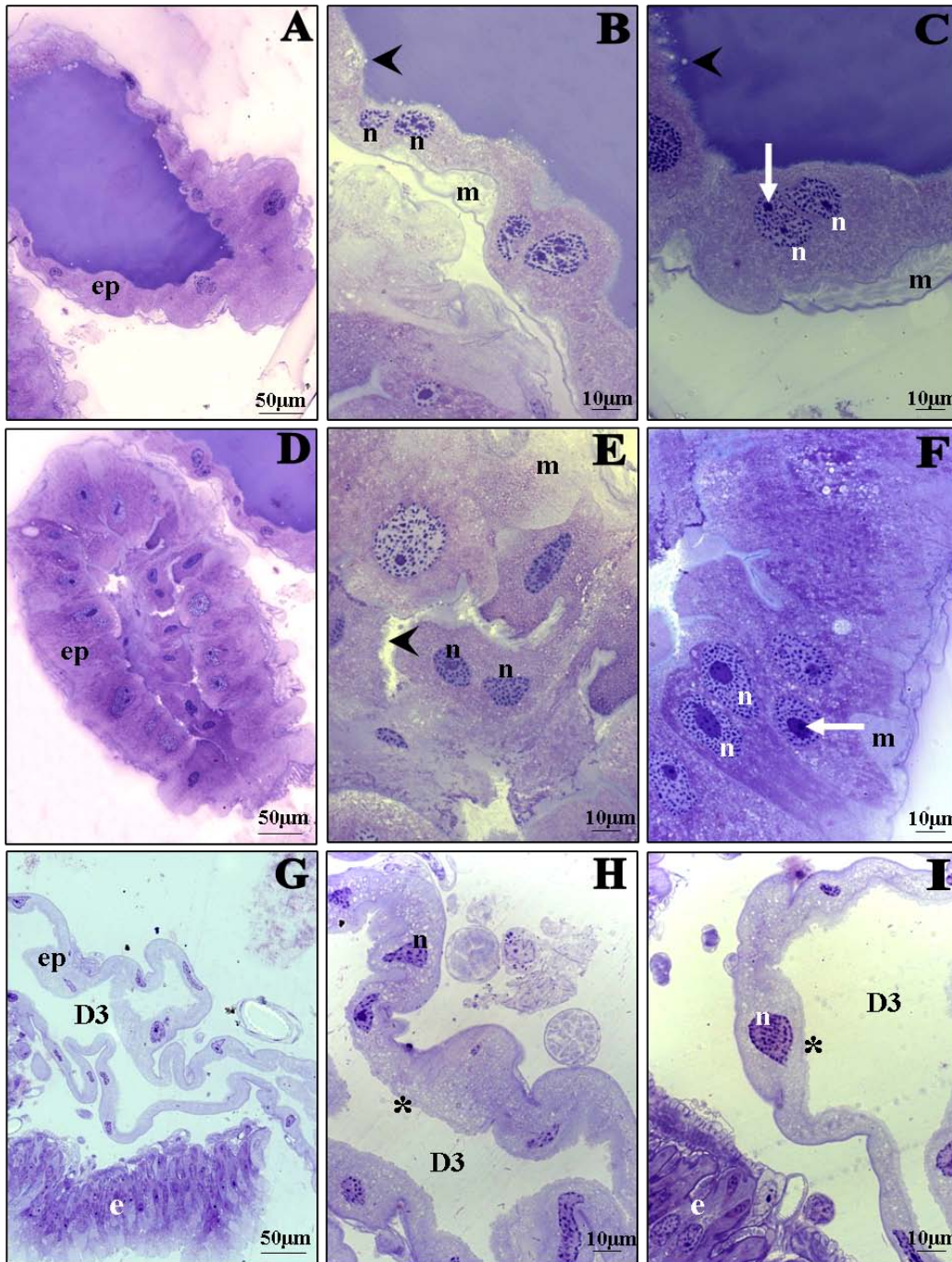


Figura 7 – Cortes histológicos dos lóbulos salivares de *P. megistus* (adulto macho) corados com Azul de Toluidina.

A-C) Visão geral (**A**) e detalhe (**B-C**) do lóbulo anterior.

D-F) Visão geral (**D**) e detalhe (**E-F**) do lóbulo mediano.

G-I) Visão geral (**G**) e detalhe (**H-I**) do lóbulo posterior (D3), aderido ao esôfago (e).

Os três lóbulos são formados por um epitélio glandular simples (ep) que delimita o lúmen, onde a saliva é armazenada. Observa-se a presença de núcleos grandes e volumosos (n) e os corpúsculos nucleolares são indicados pelas setas. Em D1 (**B-C**) e D2 (**E-F**), observa-se o revestimento por fibras musculares (m) e a presença de vesículas de secreção (cabeça-de-seta). Em D3 (**H-I**), são observadas as dobras de membrana (*).

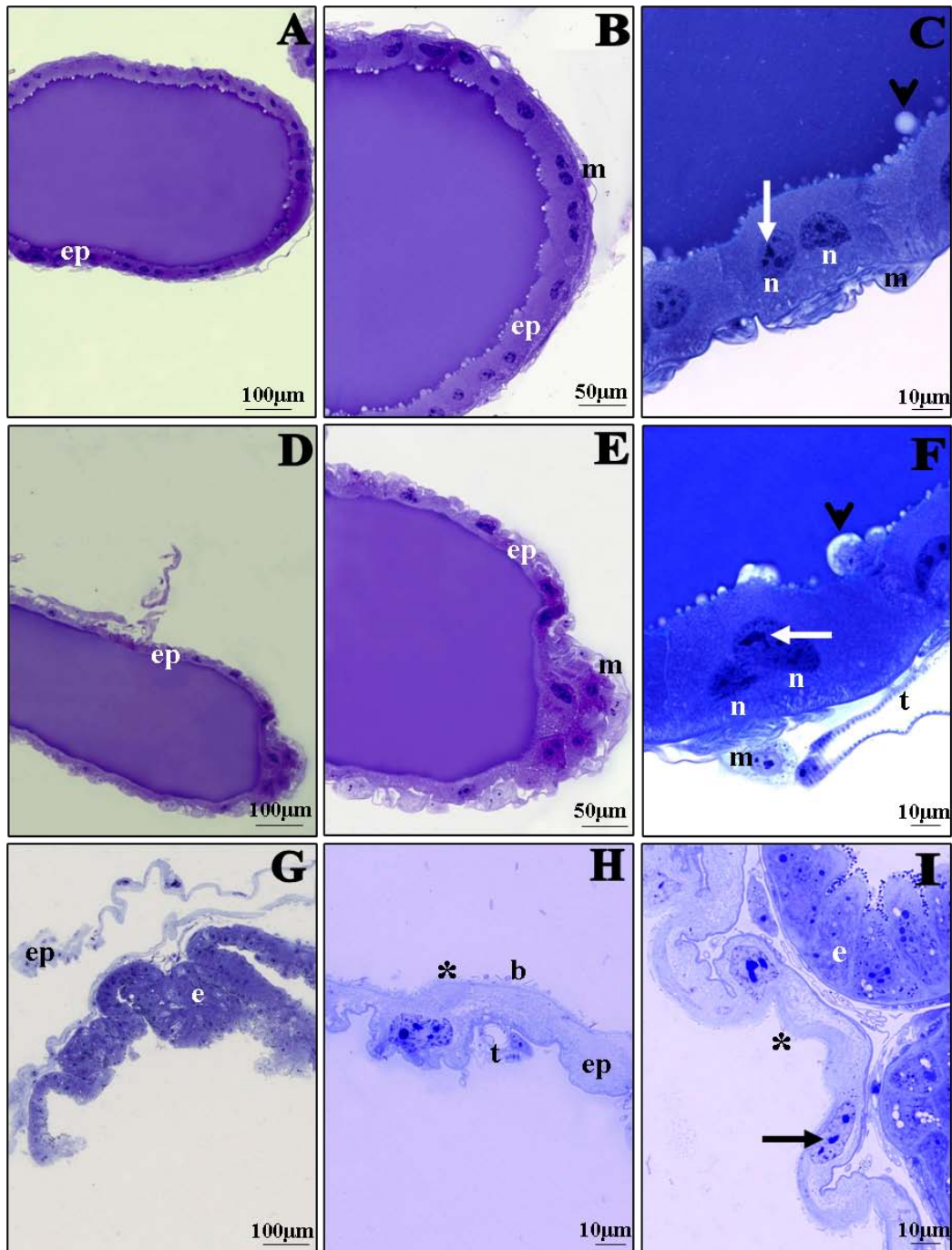


Figura 8 – Cortes histológicos dos lóbulos salivares de *T. infestans* (adulto macho) corados com Azul de Toluidina.

A-C) Visão geral (**A**) e detalhe (**B-C**) do lóbulo anterior.

D-F) Visão geral (**D**) e detalhe (**E-F**) do lóbulo mediano.

G-I) Visão geral (**G**) e detalhe (**H-I**) do lóbulo posterior (D3), aderido ao esôfago (e).

Os três lóbulos são formados por um epitélio glandular simples (ep) que delimita o lúmen, onde a saliva é armazenada. Observa-se a presença de núcleos grandes e volumosos (n) e os corpúsculos nucleolares são indicados pelas setas. Em D1 (**B-C**) e D2 (**E-F**), observa-se o revestimento por fibras musculares (m) e a presença de vesículas de secreção (cabeça-de-seta). Em **F**, uma traquéia (t) é observada em corte longitudinal. Em D3 (**H-I**), são observadas as dobras de membrana (*), uma traquéia (t) em corte transversal e bactérias (b) filamentosas e esféricas aderidas à porção apical da célula epitelial.

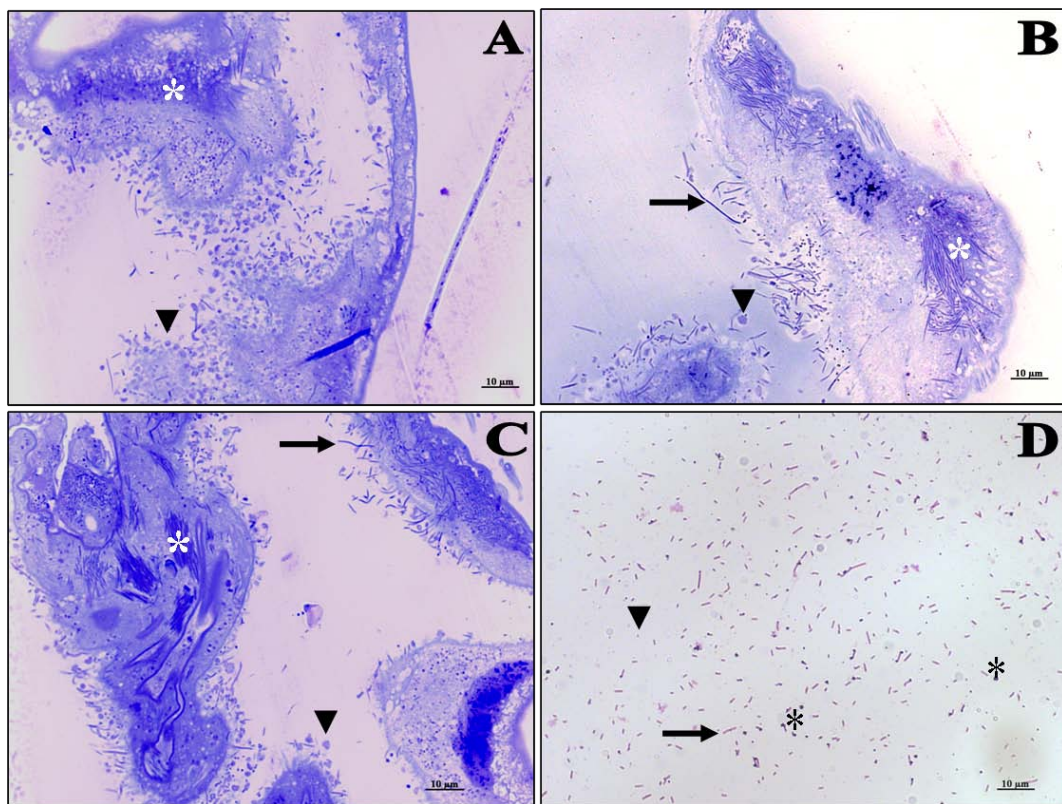


Figura 9 – Presença de bactérias no lóbulo salivar posterior e na saliva de *T. infestans*.

A-C) Corte histológico corado com Azul de Toluidina. Observar o epitélio de D3, onde são visualizadas bactérias dentro das células (*) ou aderidas à sua região apical. As bactérias apresentam as formas filamentosa (seta) e esférica (cabeça-de-seta);

D) Esfregaço da saliva corado pelo Gram. Identificação de bactérias Gram-negativas (rosa) de formato filamentoso (seta) e esférico (cabeça-de-seta) e bactérias Gram-positivas (azuis) esféricas (*).

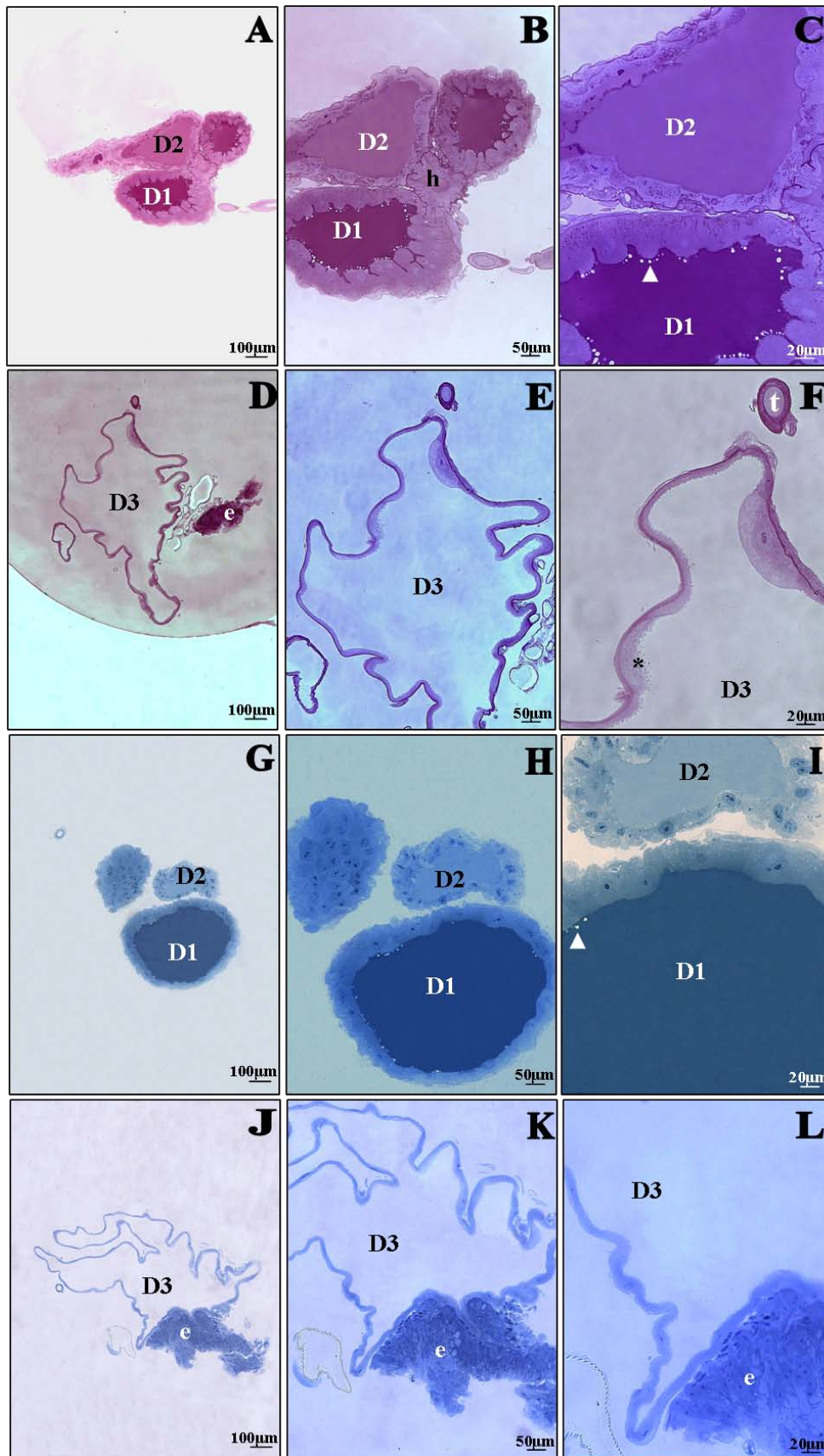


Figura 10 – Cortes histológicos dos lóbulos salivares de *P. megistus* (adulto macho) corados pelo PAS (A-F) e pelo Azul de Bromofenol (G-L).

A, G) Visão geral dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2);

B-C, H-I) Detalhes dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2). Observar a diferença da coloração dos lumens e a coloração mais intensa de D1. Em **B**, o hilo (h) é visualizado e em **C** e **I** são destacadas algumas vesículas de secreção (cabeça-de-seta);

D, J) Visão geral do lóbulo posterior (D3) aderido ao esôfago (e);

E-F, K-L) Detalhes do lóbulo posterior (D3) aderido ao esôfago (e). Observar a ausência de coloração do seu lúmen. Em **F**, são destacadas dobras de membrana (*) e uma traquéia (t).

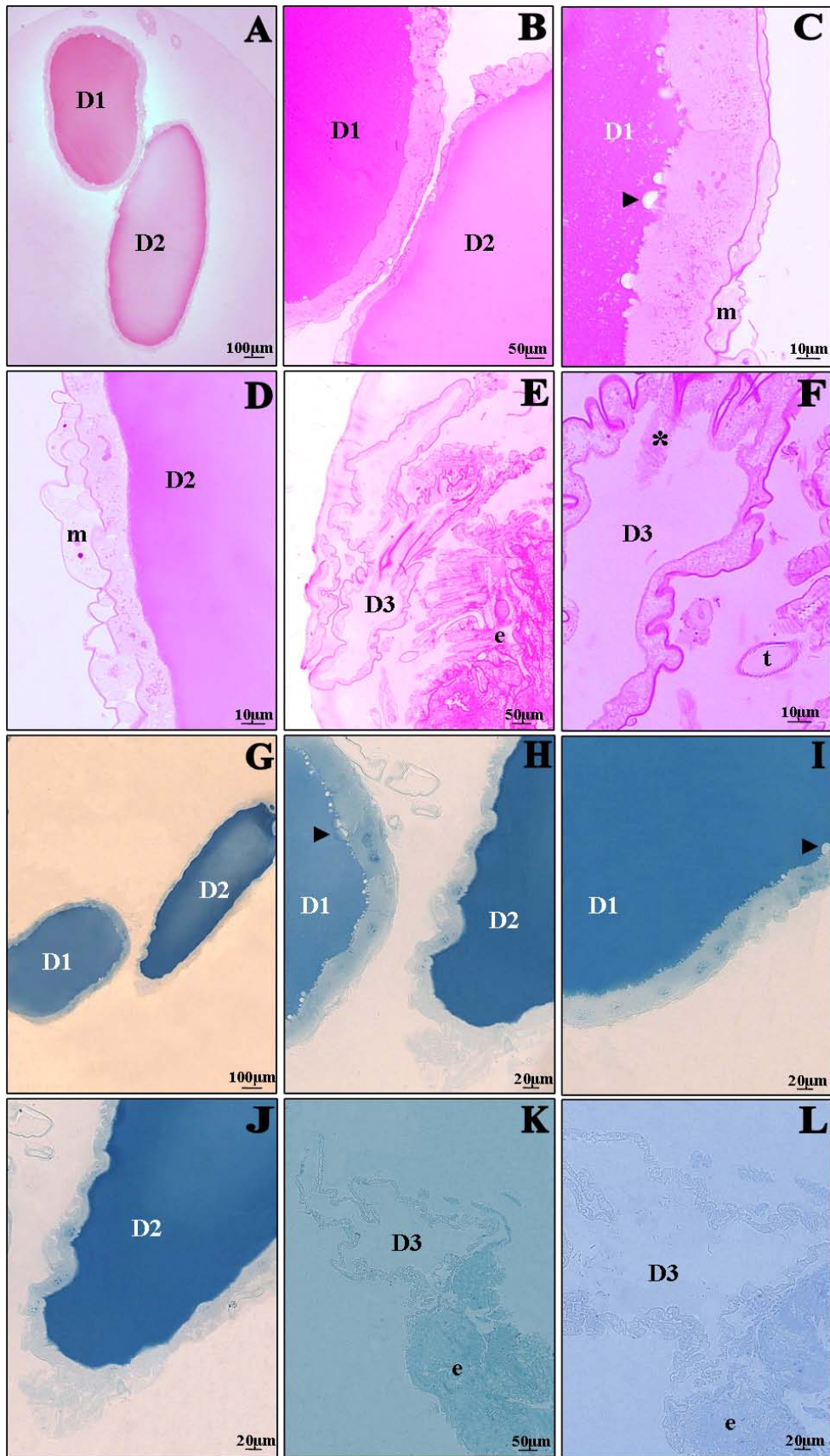


Figura 11 – Cortes histológicos dos lóbulos salivares de *T. infestans* (adulto macho) corados pelo PAS (A-F) e pelo Azul de Bromofenol (G-L).

A, G) Visão geral dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2);

B-D, H-J) Detalhes dos lóbulos anterior (D1) e mediano (D2), revestidos por fibras musculares (m). Observar a diferença da coloração dos lumens e a coloração mais intensa de D1 pelo PAS (**B, C**) e de D2 pelo Azul de Bromofenol (**H, J**). Em **C, H** e **I** são destacadas algumas vesículas de secreção (cabeça-de-seta);

D, J) Visão geral do lóbulo posterior (D3) aderido ao esôfago (e);

E-F, K-L) Detalhes do lóbulo posterior (D3) aderido ao esôfago (e). Observar a ausência de coloração do seu lúmen. Em **F**, são destacadas dobras de membrana (*) e uma traquéia (t).

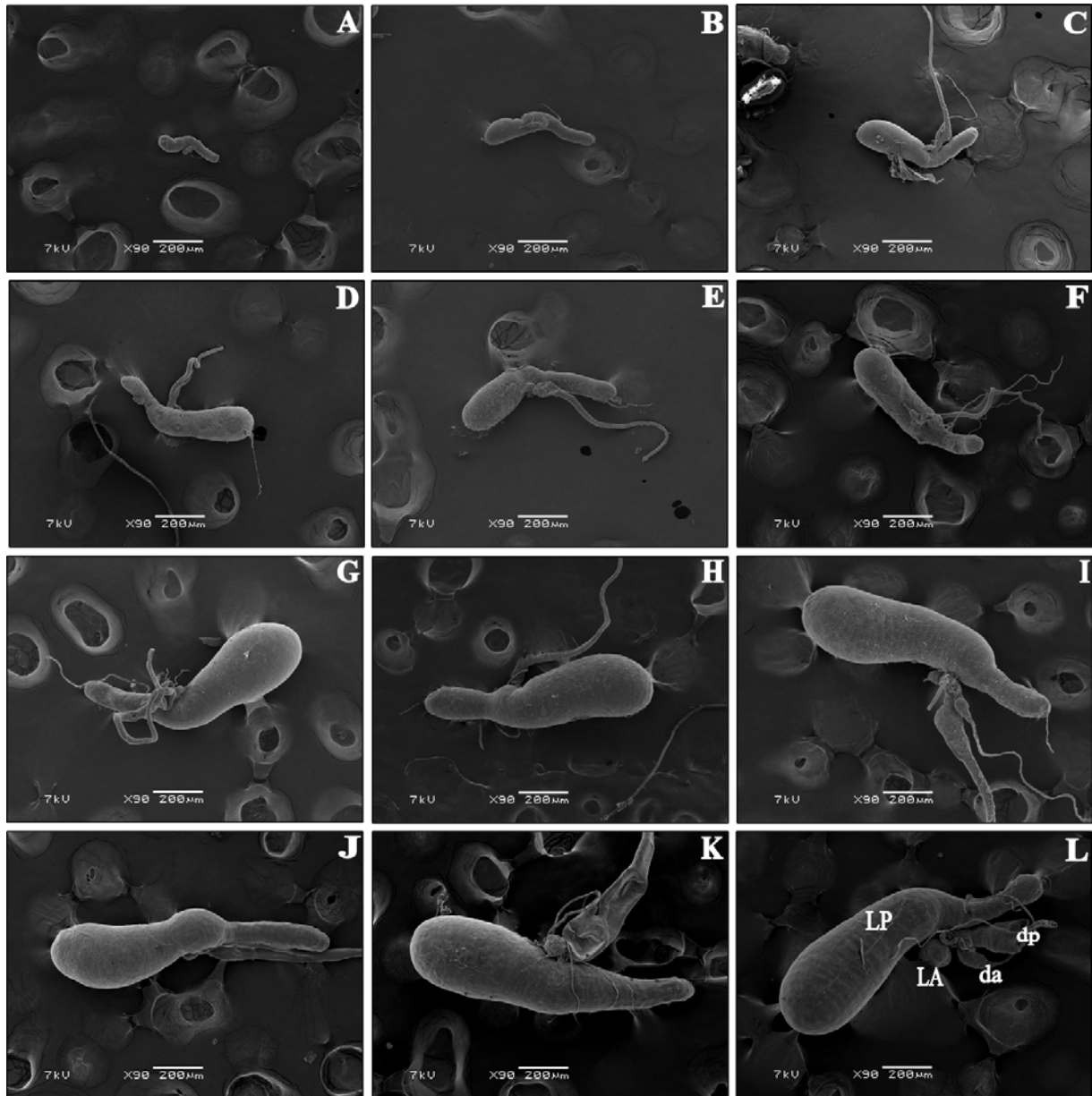


Figura 12 - Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de *R. prolixus* durante o ciclo de vida (ninfas [N] e adulto).

A) N1 jejum; **B)** N1 alimentada; **C)** N2 jejum; **D)** N2 alimentada; **E)** N3 jejum; **F)** N3 alimentada; **G)** N4 jejum; **H)** N4 alimentada; **I)** N5 jejum; **J)** N5 alimentada; **K)** Adulto jejum; **L)** Adulto alimentado. O lobo salivar é morfologicamente semelhante durante todo o ciclo de vida, sendo formado pelos lóbulos principal (LP) e acessório (LA), ductos principal (dp) e acessório (da). Além disso, observa-se o crescimento glandular ao longo do ciclo, visto que todas as micrografias estão no mesmo aumento.

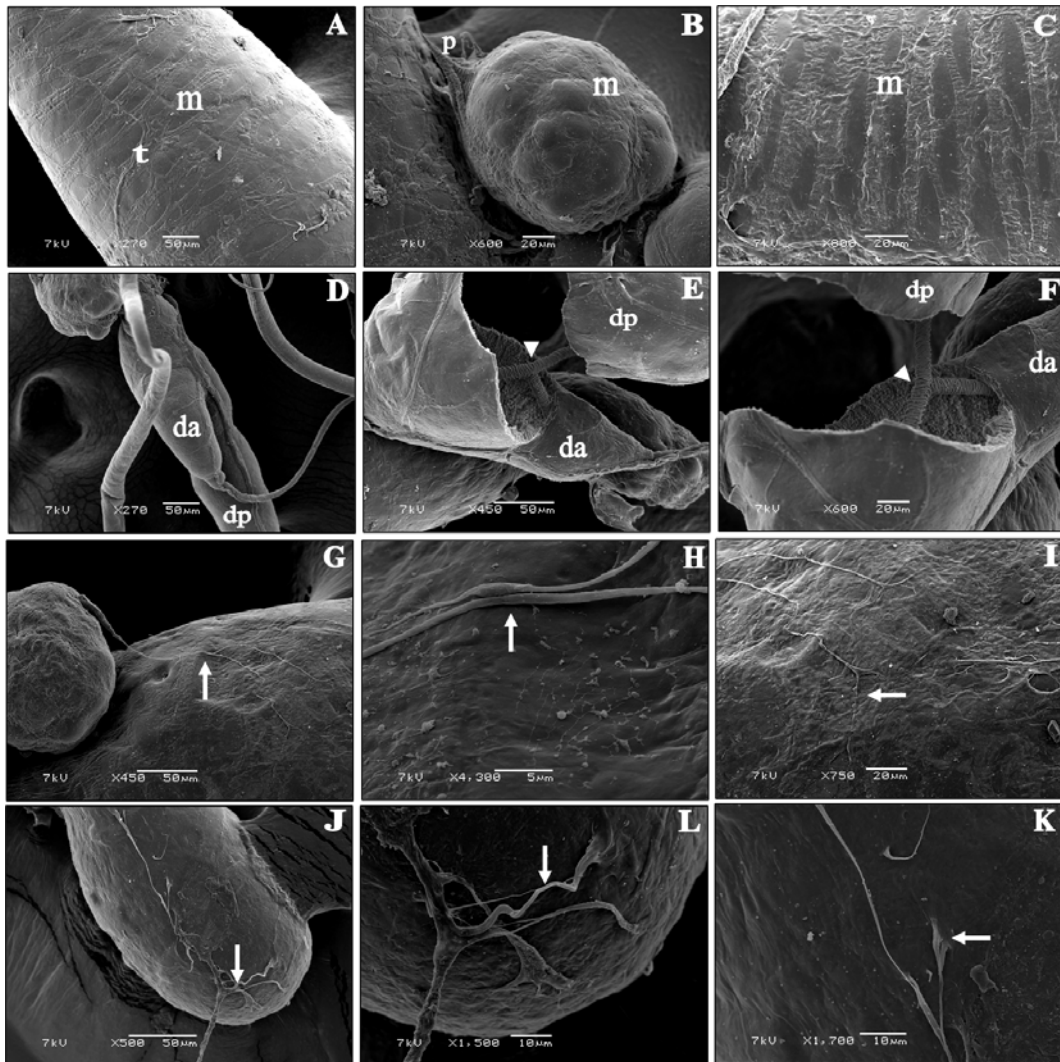


Figura 13 - Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de *R. prolixus* (adulto alimentado).

A) Detalhe do lóbulo principal, onde se observam o revestimento de fibras musculares transversais (m) e as traquéias (t);

B) Detalhe do lóbulo acessório, onde se visualiza o revestimento por fibras musculares (m) e a projeção (p);

C) Detalhe das fibras musculares (m) do lóbulo principal;

D) Ductos principal (dp) e acessório (da);

E-F) Detalhe do canal salivar (cabeça-de-seta) que se ramifica em direção aos ductos principal (dp) e acessório (da);

G-I) Nervo que alcança o lóbulo acessório e se ramifica no principal (setas);

J-L) Nervo que alcança a região lateral/posterior do lóbulo principal, onde se ramifica (setas).

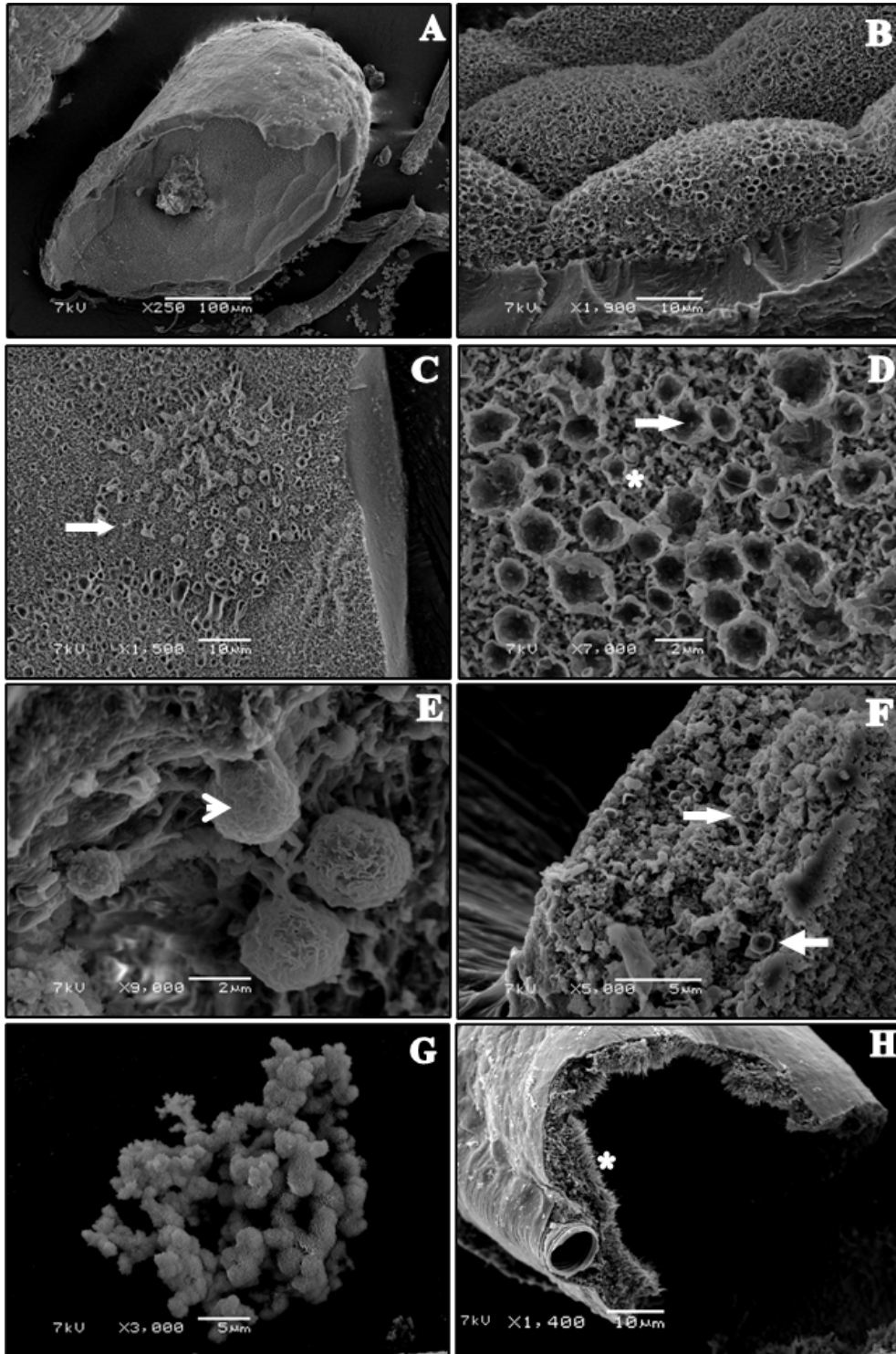


Figura 14 - Micrografias de varredura do lóbulo salivar fraturado de *R. prolixus* (ninfas de quinto estágio em jejum).

- A) Visão geral, mostrando o epitélio simples que delimita o lúmen;
- B) Detalhe do epitélio secretor, formado por células secretoras com formato regular, principalmente hexagonais, medindo cerca de 40µm;
- C) Detalhe de uma célula durante intensa secreção de vesículas (seta) para o lúmen;
- D-E) Detalhe de C, onde se observam vesículas de secreção abertas (setas) e fechadas (cabeça-de-seta), entremeadas às dobras de membrana (*). No interior das vesículas abertas, vesículas pequenas são observadas;
- F) Detalhe do interior do epitélio secretor, onde se observam vesículas pequenas (setas) dentro das células epiteliais;
- G) Aspecto de um aglomerado de vesículas de secreção;
- H) Ducto principal, onde também são visualizadas as dobras de membrana (*).

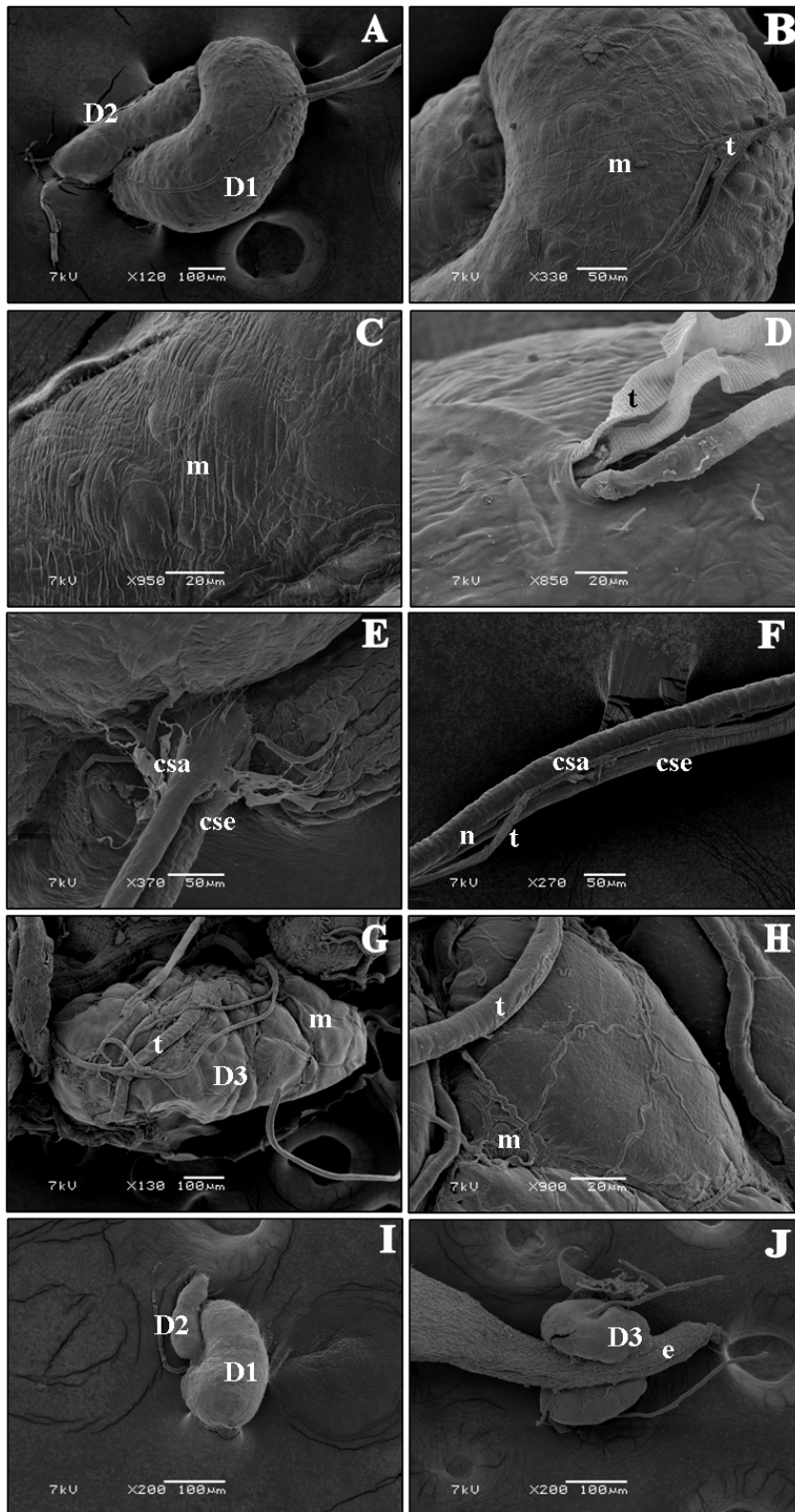


Figura 15 – Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de *P. megistus*.

A-F) Lóbulo anterior (D1) e mediano (D2) de adultos. Visão geral (**A**), detalhe de D1 (**B, D**) e D2 (**C**), onde é observado o revestimento por fibras musculares (m) e traquéias (t). **E-F)** Detalhe dos canais salivar (csa) e secundário (cse), traquéia (t) e nervo (n);

G-H) Lóbulo posterior (D3) de adultos. Visão geral (**G**) e detalhe (**H**), onde se observa a grande quantidade de traquéias (t) e algumas fibras musculares (m);

I-J) Lóbulos salivares de ninfas de primeiro estágio. D1D2 (**I**) e D3 aderido ao esôfago (e) (**J**).

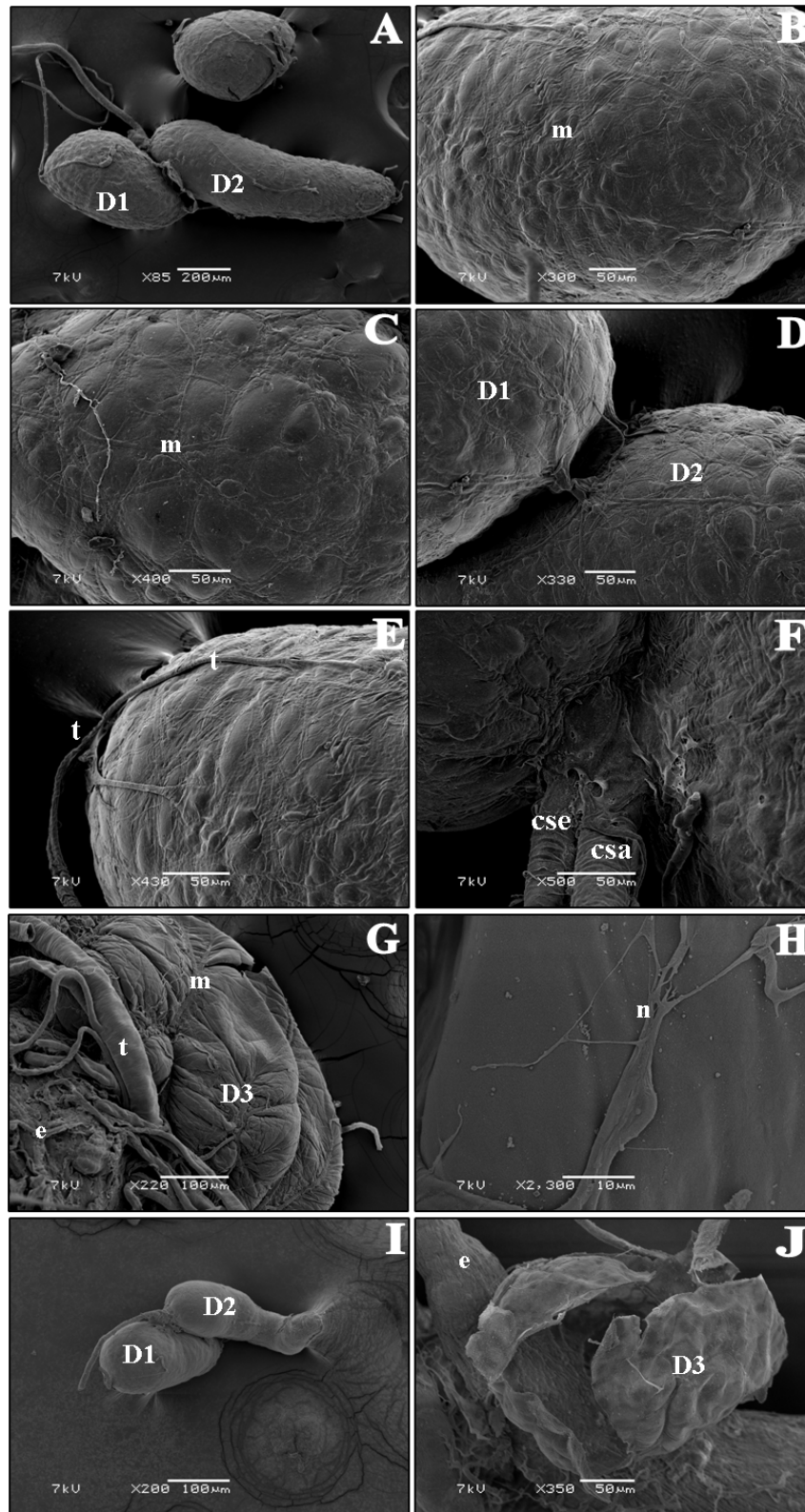


Figura 16 – Micrografias de varredura dos lóbulos salivares de *T. infestans*.

A-F) Lóbulo anterior (D1) e mediano (D2) de adultos. Visão geral (**A**), detalhe de D1 (**B, E**) e D2 (**C**), e da região onde os lóbulos se unem (**D**). Observa-se revestimento por fibras musculares (m) e traquéias (t). **F)** Detalhe dos canais salivar (csa) e secundário (cse);

G-H) Lóbulo posterior (D3) de adultos aderido ao esôfago (e). Visão geral (**G**) e detalhe (**H**), onde se observa a grande quantidade de traquéias (t) e algumas fibras musculares (m). Em **H**, observa-se o detalhe de uma fibra nervosa (n);

I-J) Lóbulos salivares de ninfas de primeiro estágio. D1D2 (**I**) e D3 aderido ao esôfago (e) (**J**).

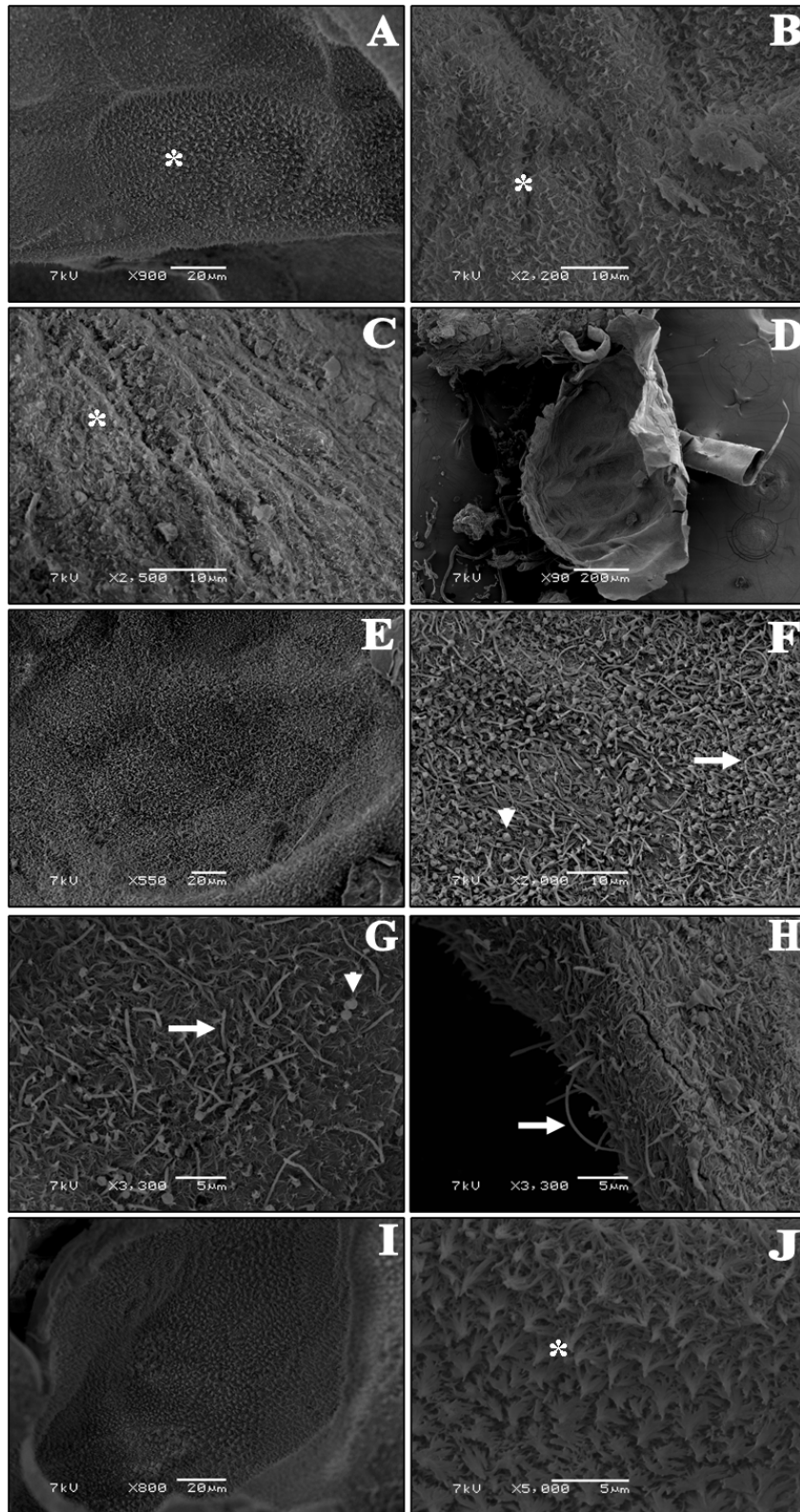


Figura 17 – Micrografias de varredura dos lóbulos salivares fraturados de *T. infestans* e *P. megistus*.

A-B) Detalhe do epitélio secretor de D1 (**A**) e D2 (**B**) de adulto e D3 (**C**) de ninfa de primeiro estágio de *T. infestans*. Observar a presença das dobras de membrana (*);

D-I) Visão geral (**D**) e detalhes (**E-H**) do epitélio secretor de D3 de adulto de *T. infestans*. Observar a presença de bactérias filamentosas (seta) e esféricas (cabeça de seta) aderidas ao epitélio;

I-J) Visão geral (**I**) e detalhes (**J**) do epitélio secretor de D3 de *P. megistus* (adulto), evidenciando a presença de dobras de membrana (*). Bactérias não são observadas.

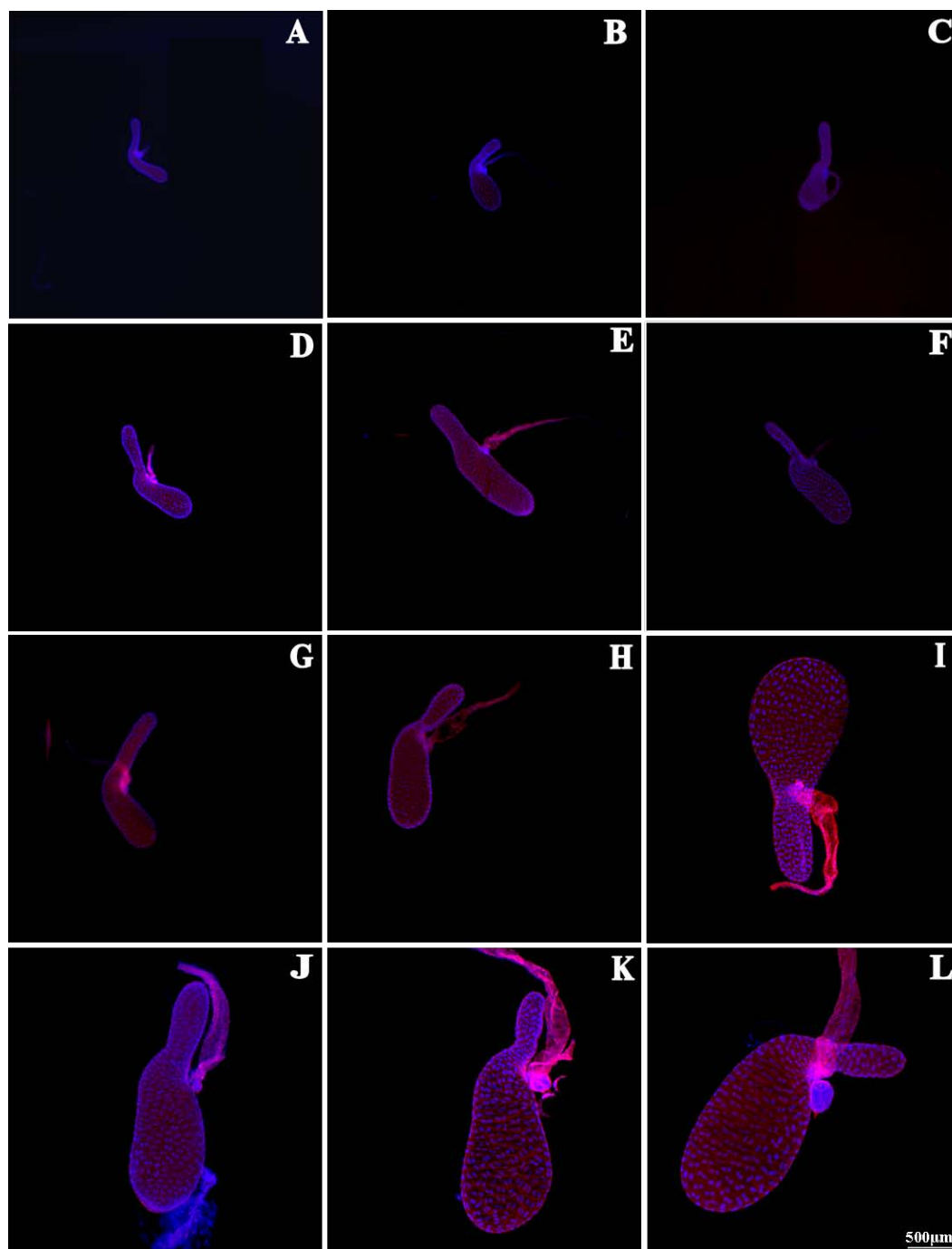


Figura 18 – Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de *R. prolixus*.

A) N1 jejum; B) N1 alimentada; C) N2 jejum; D) N2 alimentada; E) N3 jejum; F) N3 alimentada; G) N4 jejum; H) N4 alimentada; I) N5 jejum; J) N5 alimentada; K) Adulto jejum; L) Adulto alimentado. A abreviação “N” indica o estágio da ninfa. O lobo salivar é morfológicamente semelhante durante todo o ciclo de vida, sendo formado por um par de lóbulos e ductos, revestidos por fibras musculares transversais (marcadas em vermelho). Observam-se também os núcleos do epitélio glandular marcados em azul. Os lobos são apresentados no mesmo aumento e, assim, observa-se o seu crescimento contínuo.

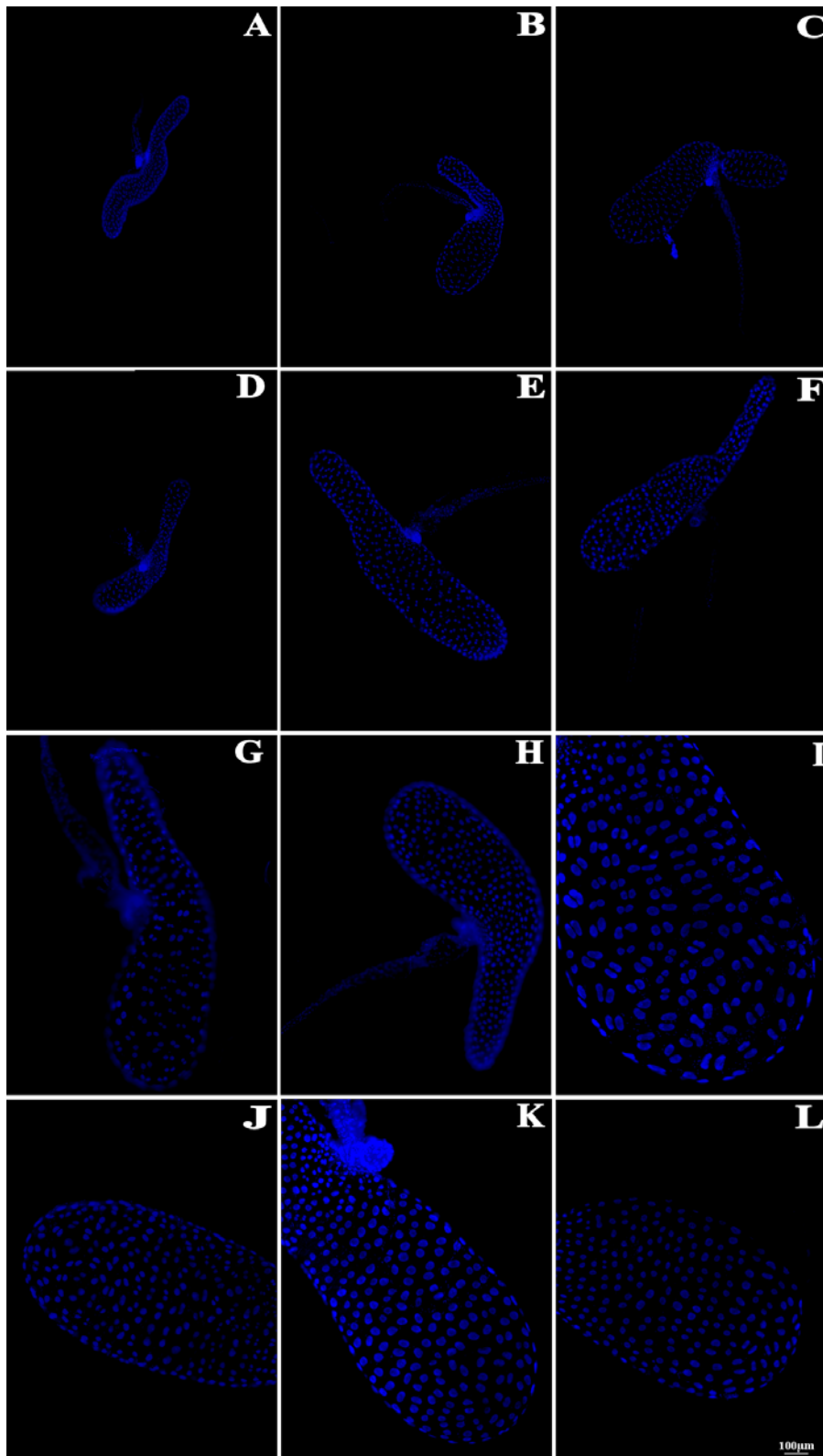


Figura 19 – Marcação nuclear dos lóbulos salivares de *R. prolixus*.

A) N1 jejum; B) N1 alimentada; C) N2 jejum; D) N2 alimentada; E) N3 jejum; F) N3 alimentada; G) N4 jejum; H) N4 alimentada; I) N5 jejum; J) N5 alimentada; K) Adulto jejum; L) Adulto alimentado. A abreviação “N” indica o estágio da ninfa. Observa-se a presença de células binucleadas durante todo o ciclo de vida. O lóbulo principal apresenta núcleos pequenos na região mediana e grandes no restante do lóbulo. Além disso, observa-se que o crescimento acontece pelo aumento do volume nuclear (e conseqüentemente celular), visto que não há diferença significativa entre o número médio de células \pm desvio padrão ($p < 0,05$) durante todo o ciclo de vida do inseto (cerca de 470 células).

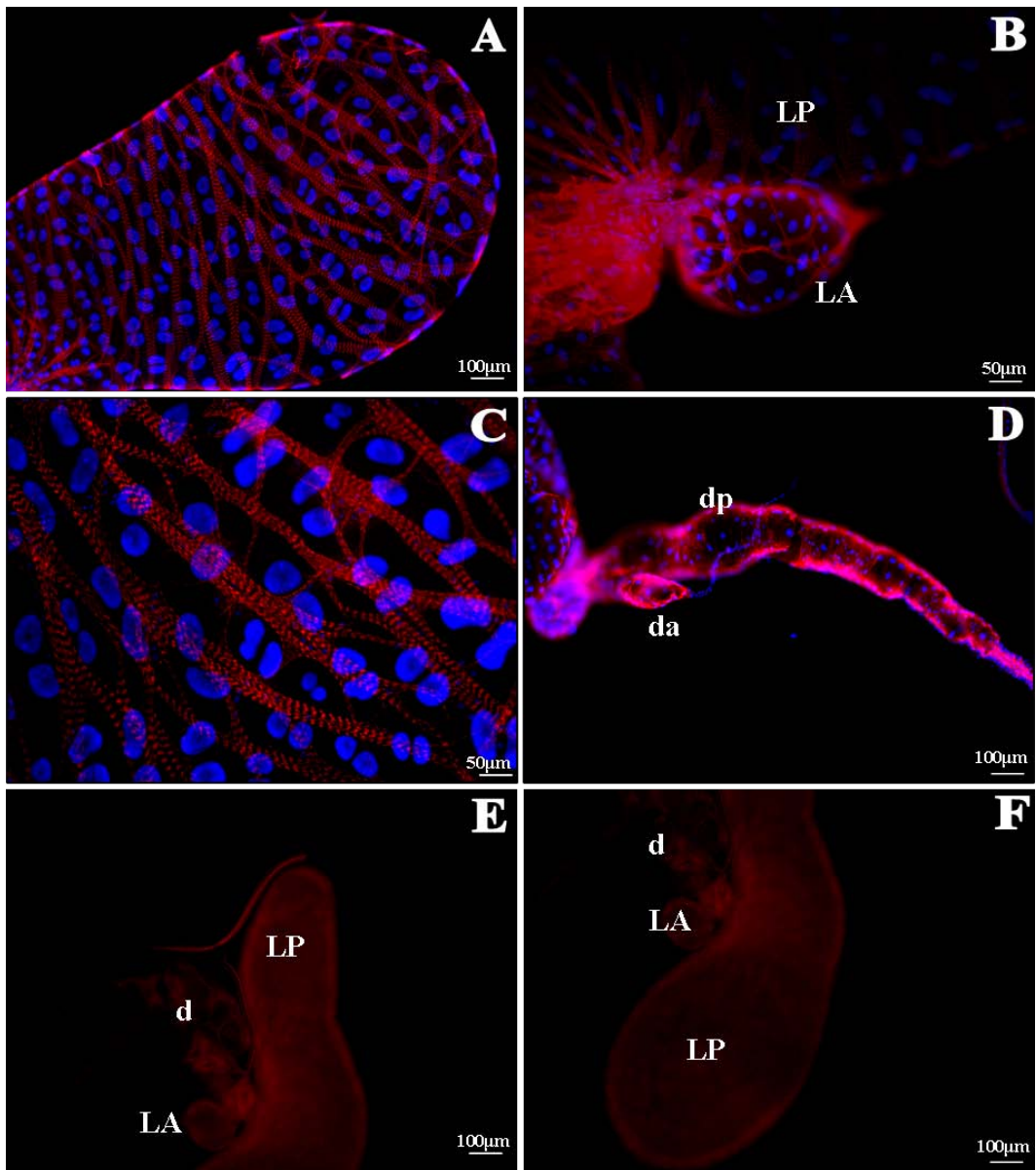


Figura 20 – Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de *R. prolixus* (adulto alimentado).

A-B) Lóbulos principal (LP) (**A**) e acessório (LA) (**B**), nas quais se visualiza o revestimento de fibras musculares transversais (em vermelho) e os dois núcleos de cada célula epitelial (em azul);

C) Detalhe do lóbulo principal, no qual se observa as fibras musculares formadas por filamentos paralelos de actina;

D) Detalhe dos ductos principal (dp) e acessório (da). O epitélio apresenta núcleos pequenos (azuis) e é revestido por células musculares (vermelhas);

E-F) Controle (material incubado em PBS): observa-se a ausência de marcação específica em todo o órgão (lóbulos principal [LP], acessório [LA] e ductos [d]), comprovando a veracidade da técnica.

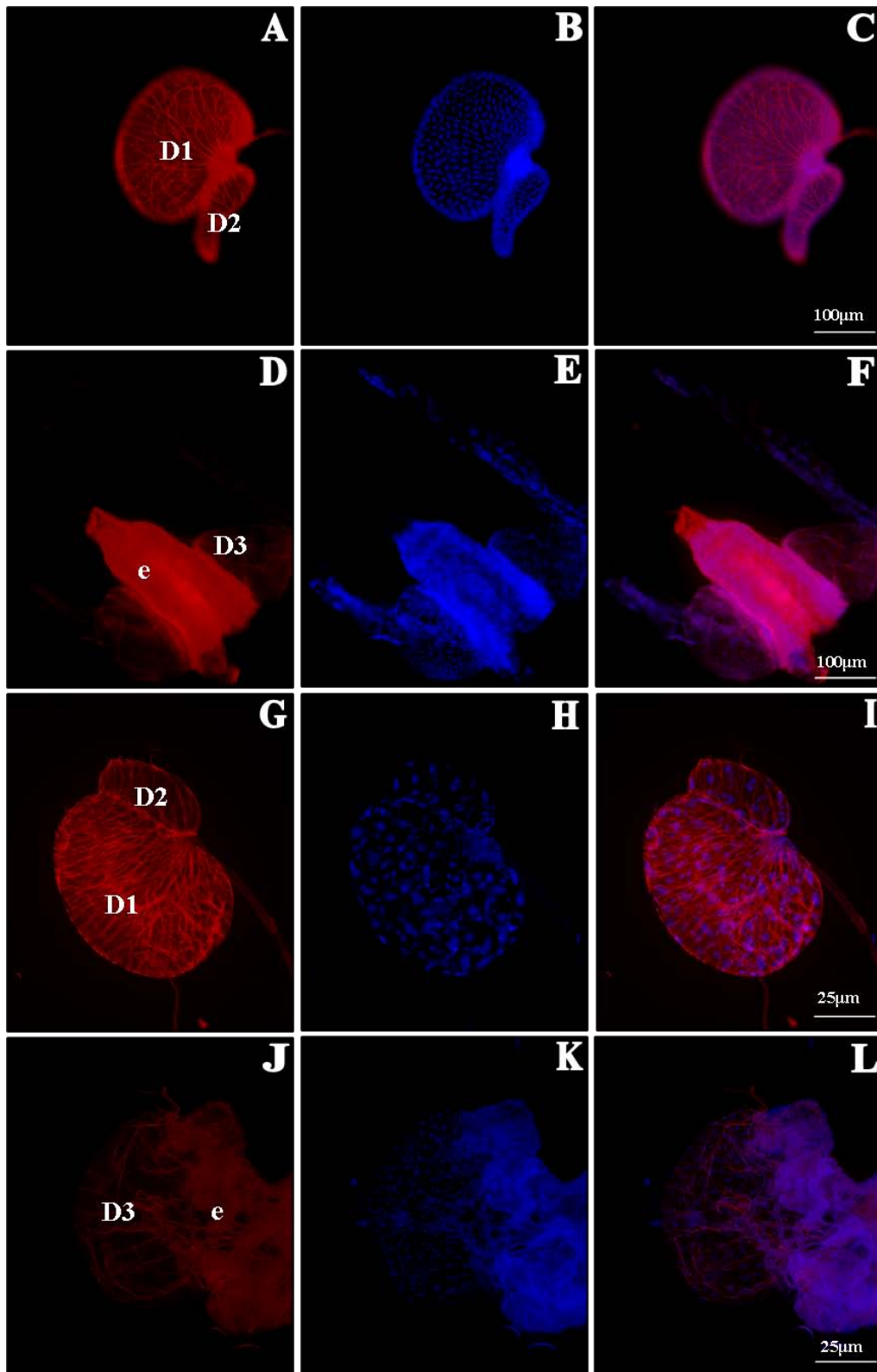


Figura 21 – Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de *P. megistus*.

A-C, G-I) Lóbulo salivar anterior (D1) e mediano (D2) de ninfas de primeiro estágio (**A-C**) e adultos (**G-I**). Observa-se o revestimento de fibras musculares (vermelho), formado por filamentos transversais de actina, e os dois núcleos de cada célula do epitelial (azul). Durante o ciclo de vida do inseto, os lóbulos apresentam o mesmo número médio de células: 647 em D1 e 205 em D2;

D-F, J-K) Lóbulo salivar posterior (D3) e esôfago (e) de ninfas de primeiro estágio (**D-F**) e adultos (**J-K**). Observa-se a presença de algumas fibras musculares ramificadas (vermelho) e a presença de núcleos pequenos e numerosos no epitélio (azul).

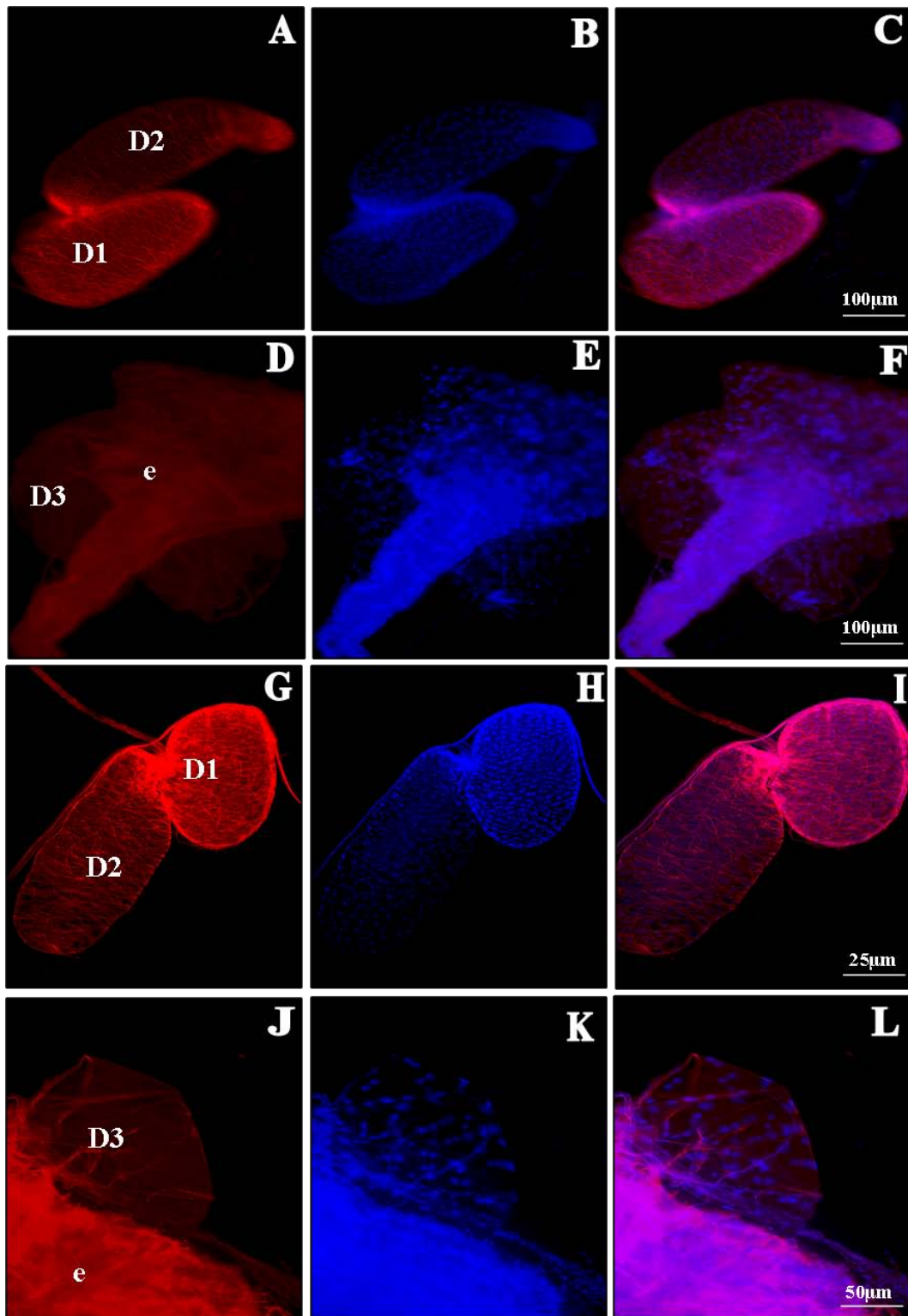


Figura 22 – Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de *T. infestans*.

A-C, G-I) Lóbulo salivar anterior (D1) e mediano (D2) de ninfas de primeiro estágio (**A-C**) e adultos (**G-I**). Observa-se o revestimento de fibras musculares (vermelho), formado por filamentos transversais de actina, e os dois núcleos de cada célula do epitelial (azul). Durante o ciclo de vida do inseto, os lóbulos apresentam o mesmo número médio de células: 502 em D1 e 487 em D2;

D-F, J-K) Lóbulo salivar posterior (D3) e esôfago (e) de ninfas de primeiro estágio (**D-F**) e adultos (**J-K**). Observa-se a presença de algumas fibras musculares ramificadas (vermelho) e a presença de núcleos pequenos e numerosos no epitélio (azul).

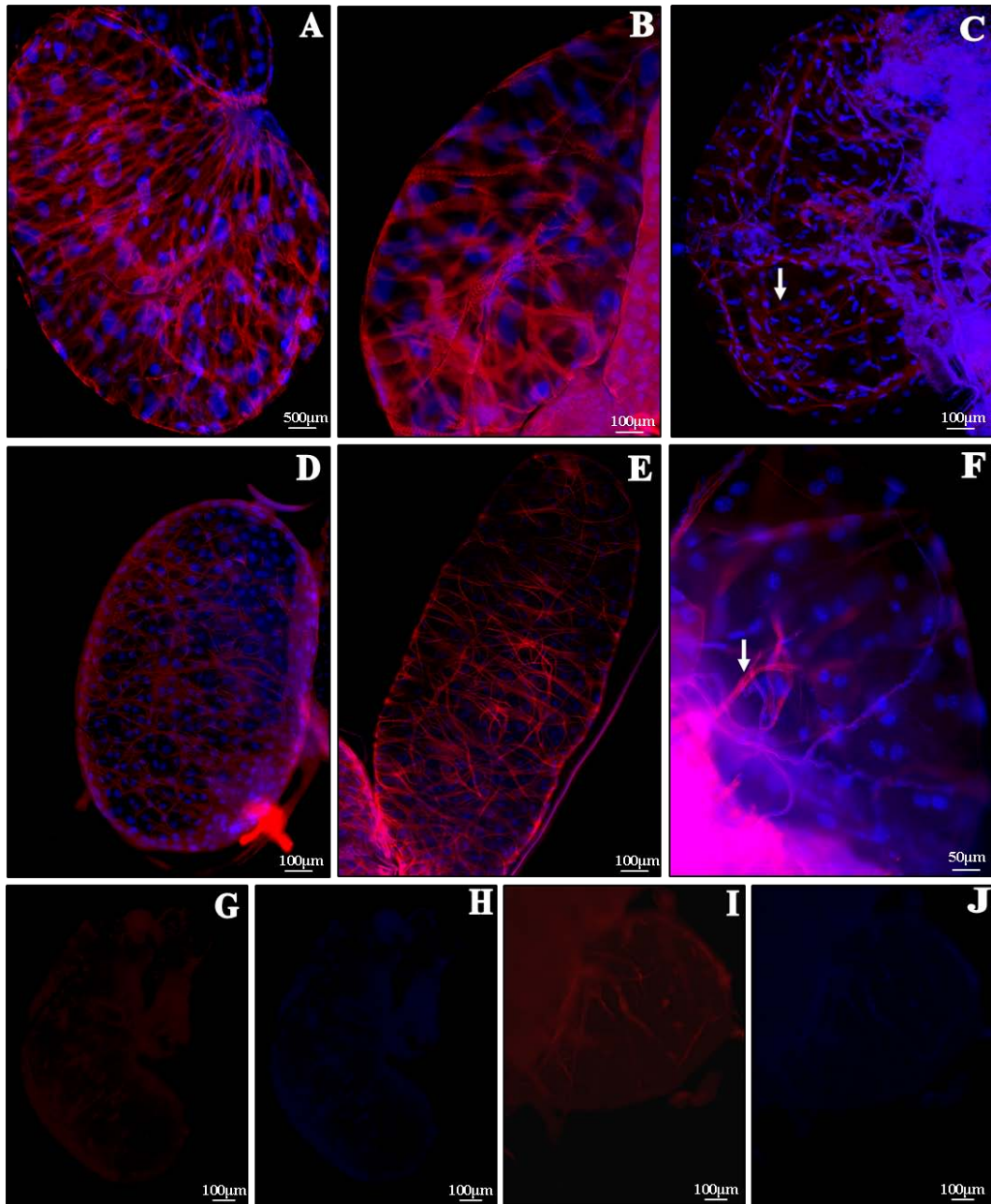


Figura 23 – Marcação nuclear e do citoesqueleto dos lóbulos salivares de *P. megistus* e *T. infestans*.

A-B, D-E) Detalhes dos lóbulos anteriores (**A, D**) e medianos (**B, E**) de *P. megistus* (**A, B**) e *T. infestans* (**D, E**). Observa-se os núcleos das células epiteliais (azul) e as fibras musculares revestindo toda a estrutura dos lóbulos (vermelho). Em detalhe, essas fibras musculares são formadas por filamentos paralelos de actina;

C, F) Detalhe do lóbulo salivar posterior de *P. megistus* (**C**) e *T. infestans* (**F**). Observar a presença de algumas fibras musculares ramificadas (setas) envolvendo o lóbulo. Os núcleos das células epiteliais são visualizados em azul. Em **F**, observa-se que as células são binucleadas.

G-J) Controle (material incubado em PBS): observa-se ausência de fluorescência específica para D1D2 (**G, H**) e D3 (**I, J**), comprovando a veracidade da técnica.

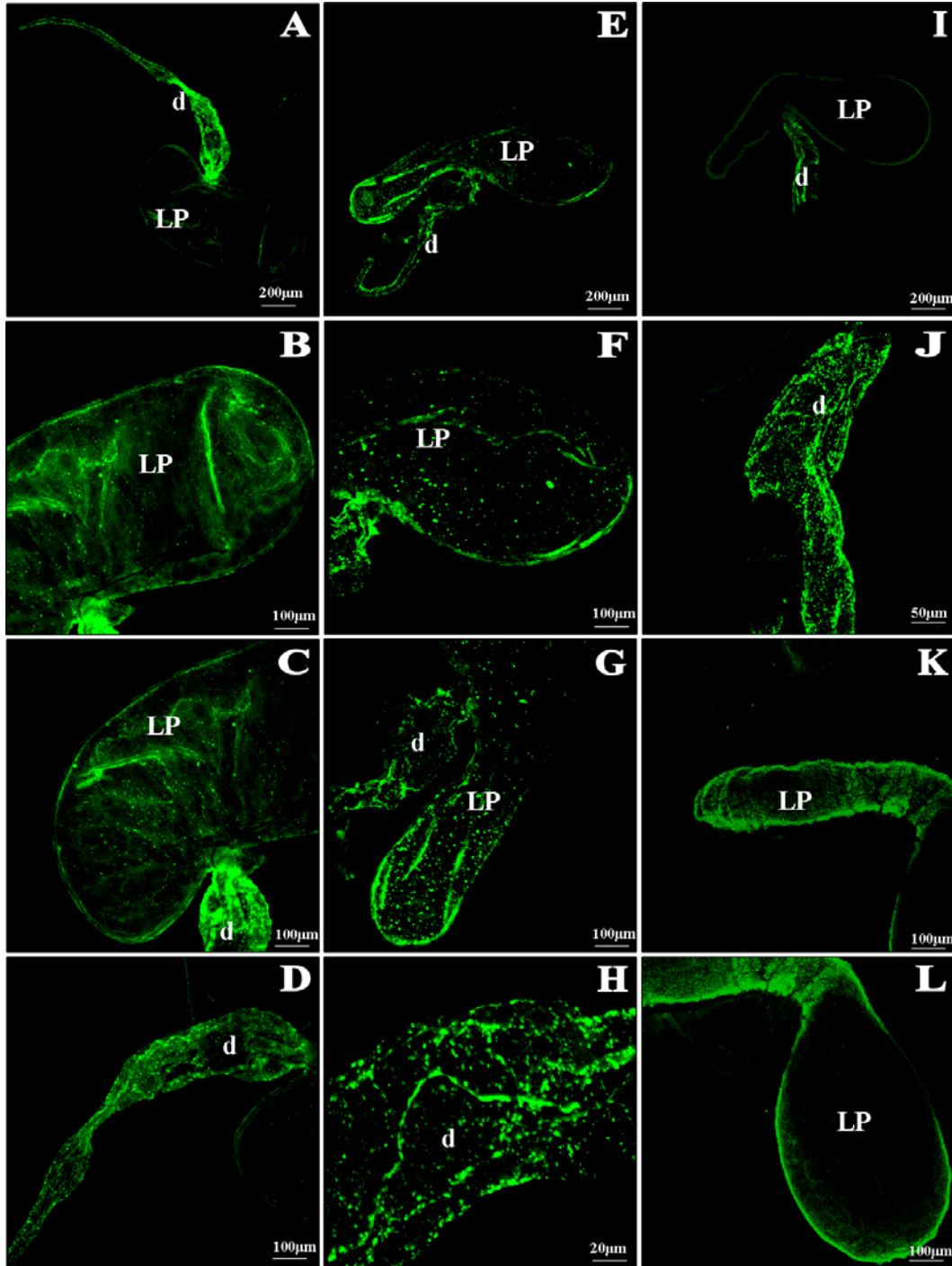


Figura 24 – Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) dos lóbulos salivares de *R. prolixus*.

A-D) Lóbulo salivar de insetos estimulados a alimentar: visão geral (**A**), região anterior (**B**), posterior (**C**) e ductos (**D**). De modo geral, observa-se uma marcação linear fraca e em todo o lóbulo principal (LP), que se ramifica a partir da região mediana (**B-C**). Marcação mais intensa é observada nos ductos (d) (**D**);

E-H) Lóbulo salivar de insetos durante alimentação: visão geral (**E**), região anterior (**F**), posterior (**G**) e ducto (**H**). De modo geral, observa-se uma marcação intensa em todo o lóbulo principal (LP), acessório (LA) e ductos (d). Em **H**, detalhe do ducto;

I-J) Lóbulo salivar de insetos em jejum: observa-se atividade serotoninérgica apenas nos ductos (d). Detalhe em **J**.

K-L) Controle: Lóbulo salivar de insetos durante alimentação incubado apenas com o anticorpo secundário. Observa-se apenas a autofluorescência da glândula, o que comprova a veracidade da técnica.

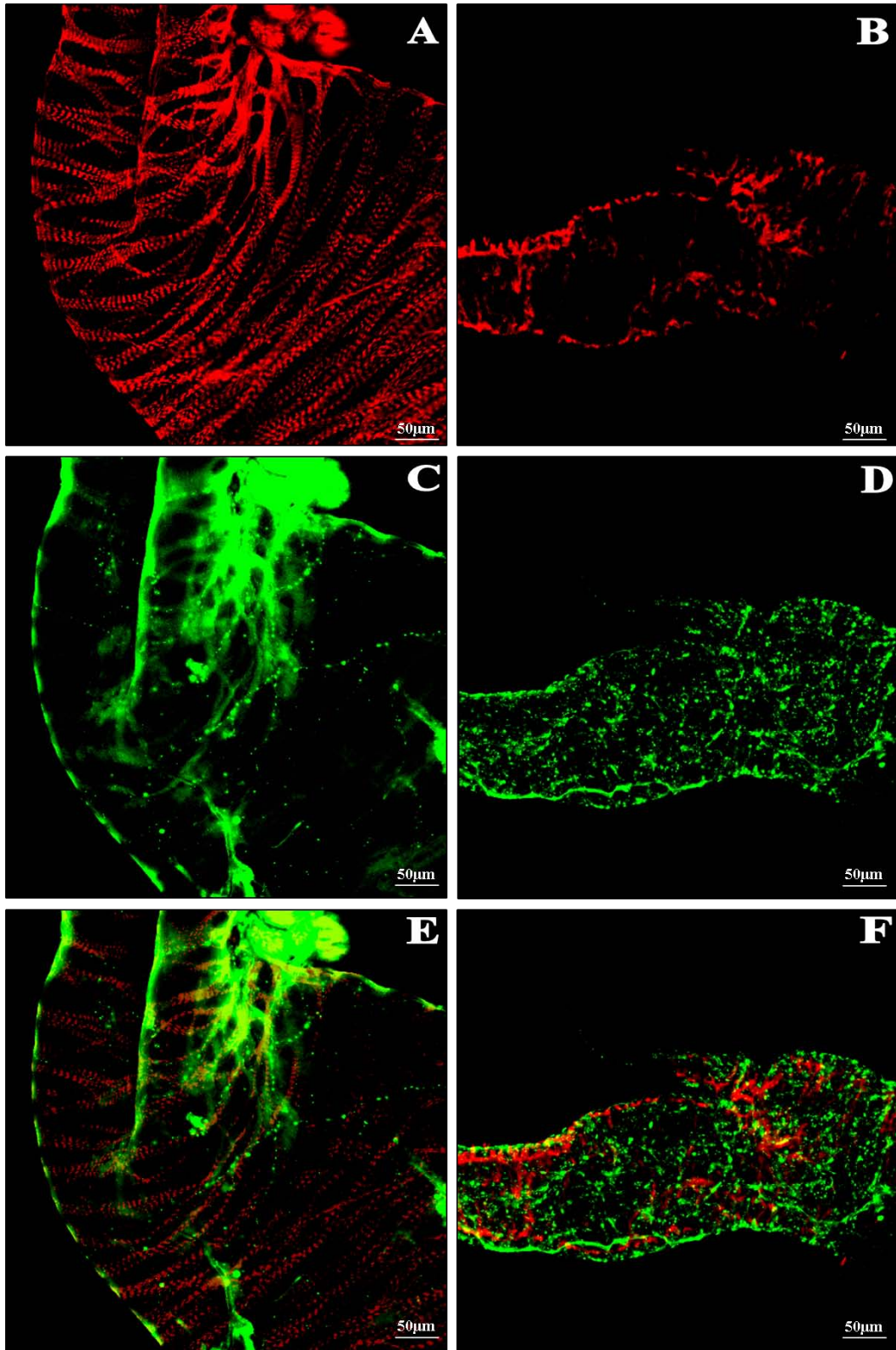


Figura 25 – Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) e marcação das fibras musculares dos lóbulos salivares de *R. prolixus*.

A, C, E) Lóbulo principal envolvido por uma rede de fibras nervosas serotoninérgicas (verde) que se ramificam e acompanham as fibras musculares (vermelho);

B, D, F) Detalhe do ducto principal, revestido por fibras musculares (vermelho) e com intensa atividade de neurônios serotoninérgicos (verde).

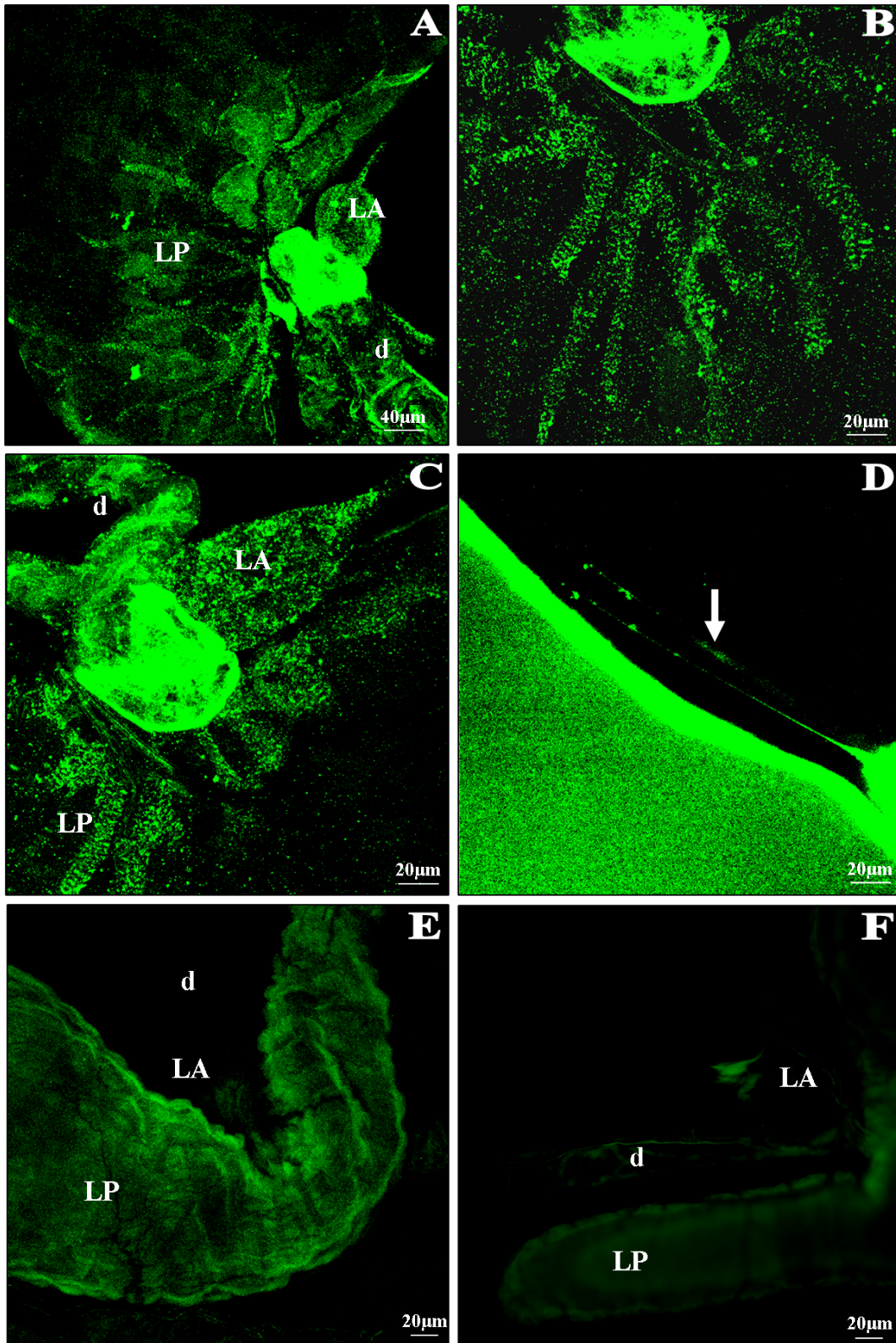


Figura 26 – Imunomarcção das fibras nervosas (anti-tirosina-hidroxilase) dos lóbulos salivares de *R. prolixus*.

A-D) Lobo salivar de insetos durante alimentação: **A)** região mediana, onde se observa intensa marcação na camada muscular mediana do lóbulo principal (LP), lóbulo acessório (LA) e ducto (d). Em detalhe, observa-se a atividade intensa na camada muscular mediana **(B)**, no lóbulo acessório **(C)** e no nervo salivar (seta) **(D)**;

E) Lobo salivar de insetos em jejum: observa-se ausência de atividade em todo o órgão (lóbulos principal [LP] e acessório [LA] e ducto [d]);

F) Controle: lobo salivar de insetos durante alimentação incubado apenas com o anticorpo secundário. Ausência total de marcação em todo o órgão (lóbulos principal [LP] e acessório [LA] e ducto [d]), o que comprova a veracidade da técnica.

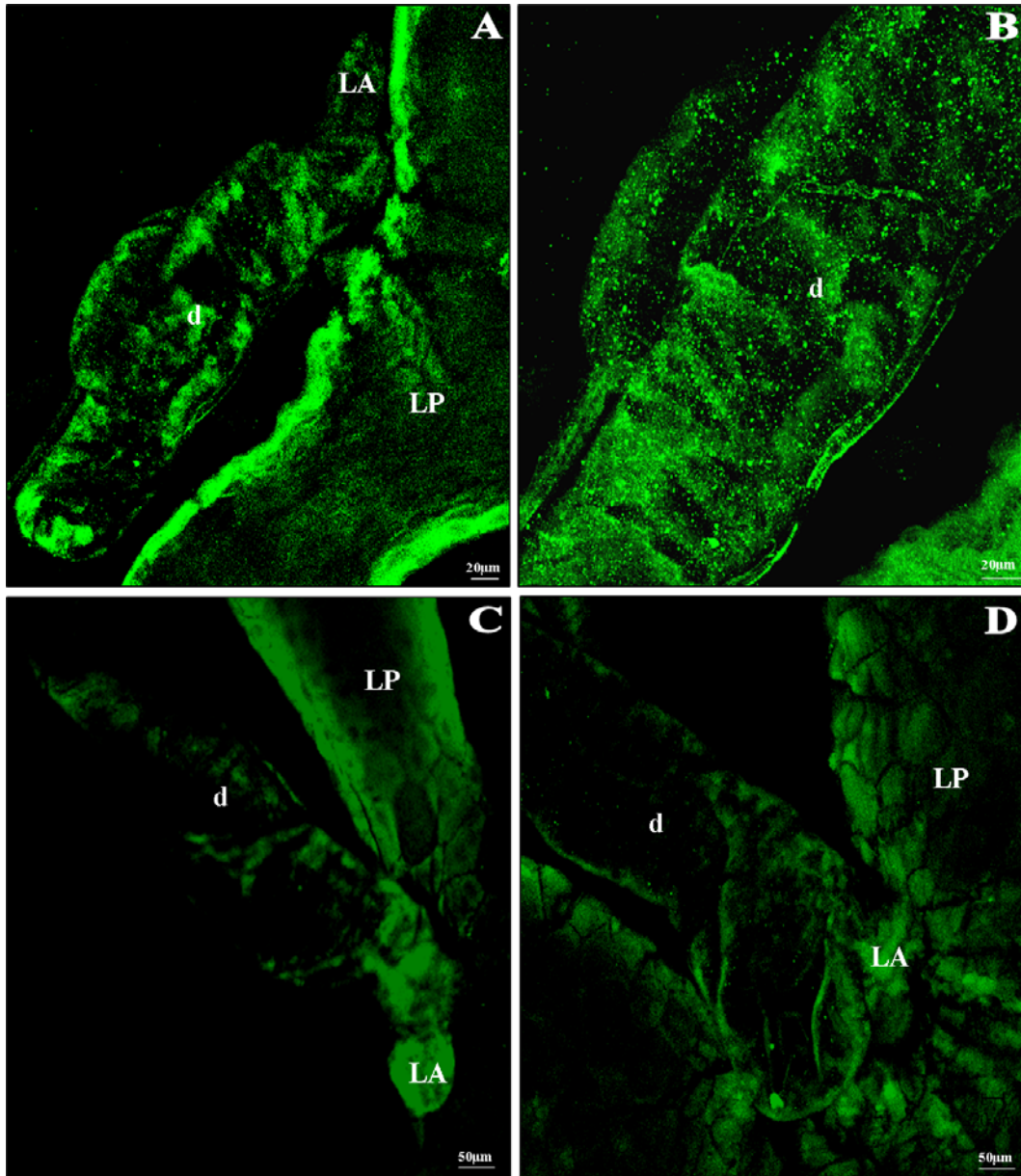


Figura 27 – Imunomarcção das fibras nervosas (anti-dopamina) dos lóbulos salivares de *R. prolixus*.

A-B) Lobo salivar de insetos durante alimentação: atividade dopaminérgica observada apenas nos ductos (d). Detalhe em **B**;

C) Lobo salivar de insetos em jejum: observa-se ausência de atividade em todo o órgão (lóbulos principal [LP] e acessório [LA] e ducto [d]);

D) Controle: lobo salivar de insetos durante alimentação incubado apenas com o anticorpo secundário. A ausência de marcação comprova a veracidade da técnica.

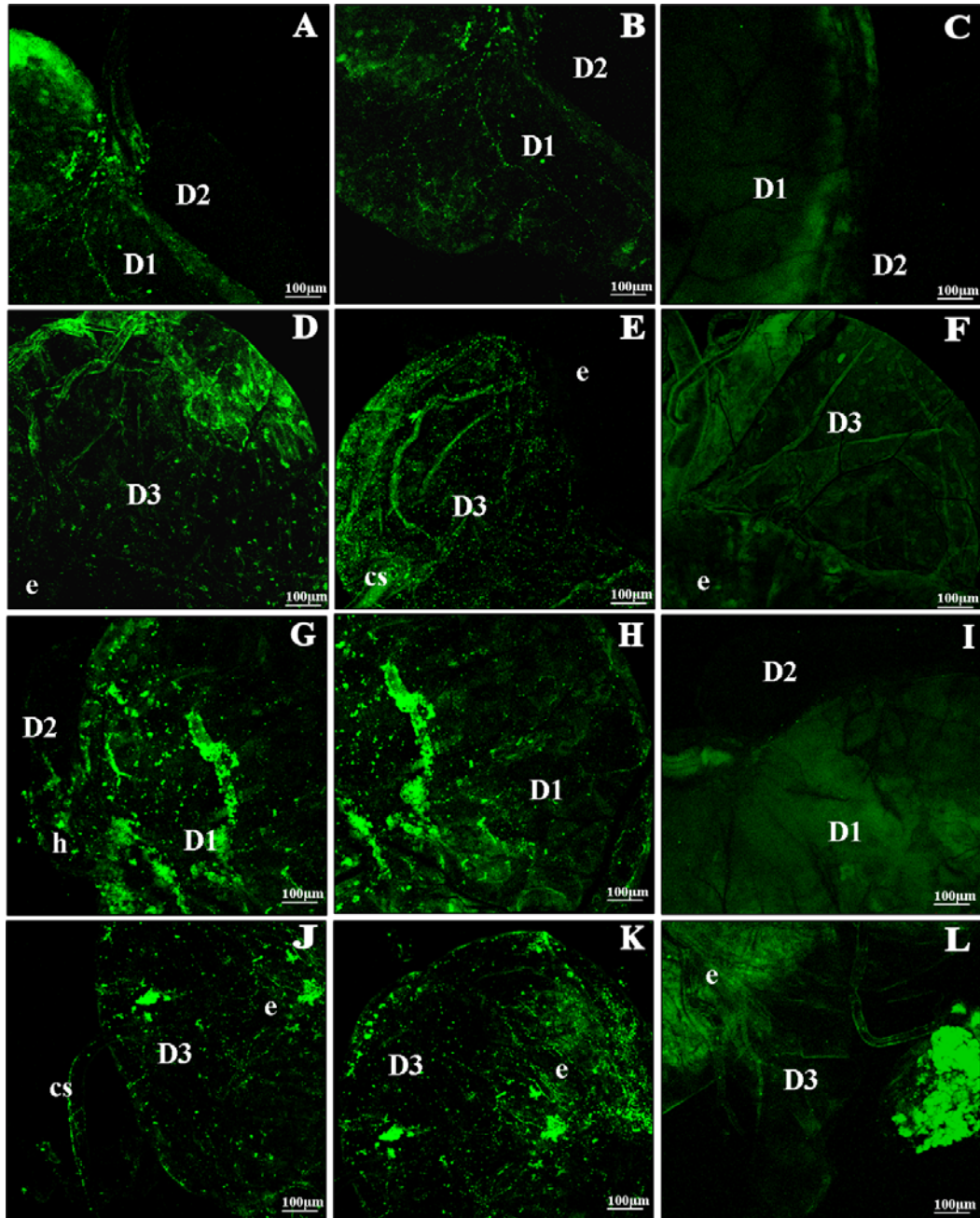


Figura 28– Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) dos lóbulos salivares de *P. megistus*.

A-F) Lóbulos anterior (D1), mediano (D2) (**A-C**) e posterior (D3) (**D-F**) de insetos em jejum.

A-B) Observar a marcação linear que parte da região mediana de D1 e se ramifica em todo o lóbulo. Em D2, nenhuma marcação é visualizada (**B**). **D-E)** Observar a marcação em todo D3, na forma de pontos fortemente marcados. Observar a forte marcação no canal secundário (cs). Em **C** e **F**, o material foi incubado apenas no anticorpo secundário (controles). Observa-se apenas a auto-fluorescência do órgão e a falta de marcação específica;

G-L) Lóbulos anterior (D1), mediano (D2) (**G-I**) e posterior (D3) (**J-L**) de insetos durante alimentação. **G-H)** Observar a intensa marcação linear e ramificada em todo D1. D2 também apresenta marcações, principalmente na região do hilo (h). **J-K)** Observar a marcação em todo o D3, na forma de pontos fortemente marcados e uma forte marcação linear que percorre todo o canal secundário (cs). No esôfago (e) são observadas marcações lineares que chegam a D3. Em **I** e **L**, o material foi incubado apenas no anticorpo secundário (controles). Observa-se apenas a auto-fluorescência do órgão e a falta de marcação específica.

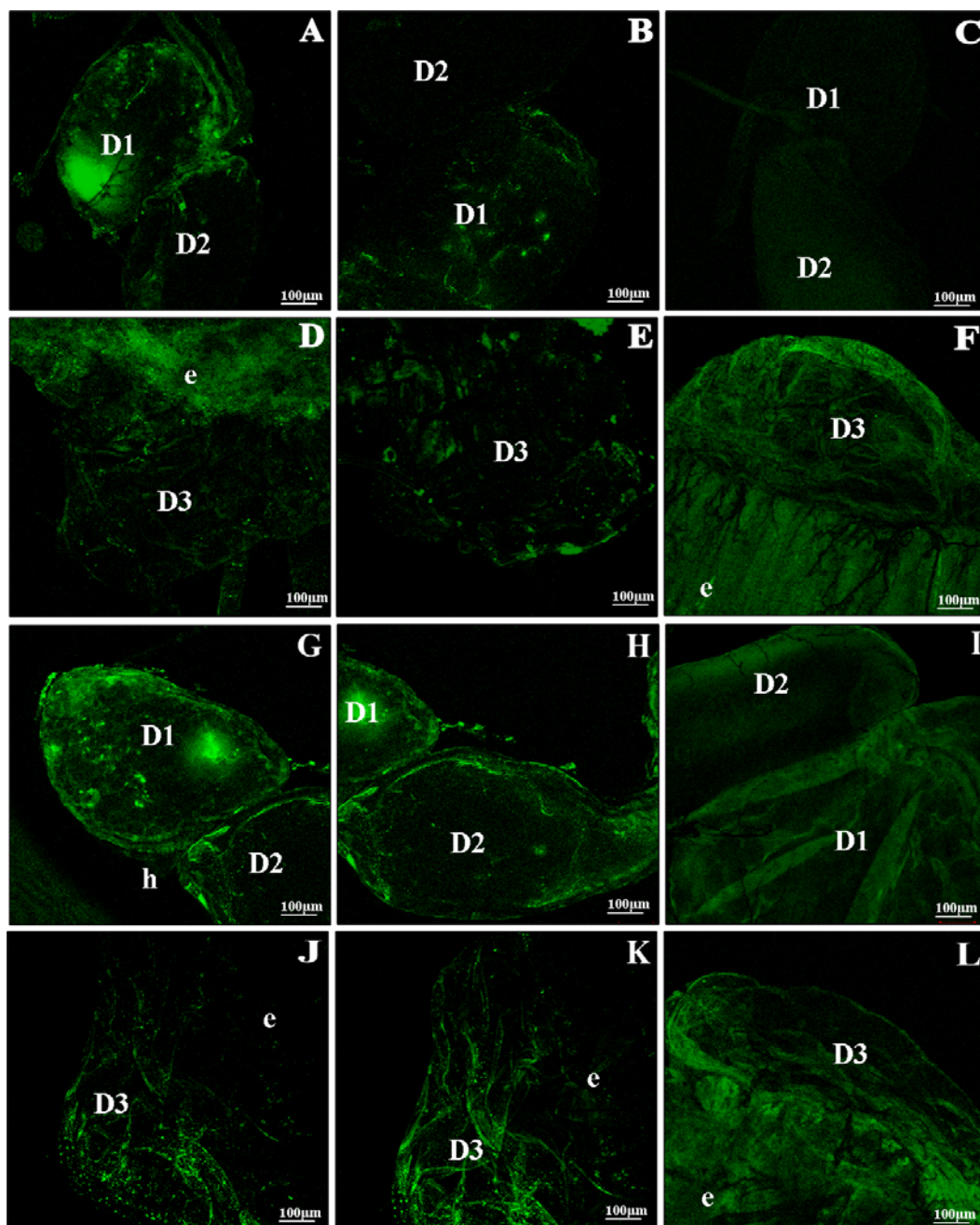


Figura 29– Imunomarcção das fibras nervosas (anti-serotonina) dos lóbulos salivares de *T. infestans*.

A-F) Lóbulos anterior (D1), mediano (D2) (**A-C**) e posterior (D3) (**D-F**) de insetos em jejum. **A-B)** Observar a marcação linear que parte da região anterior de D1 e se ramifica (**A-B**). Em D2, nenhuma marcação é visualizada (**A**). **D-E)** Observar a presença de uma marcação pontuada em algumas regiões de D3, na forma de pontos fortemente marcados. Em **C** e **F**, o material foi incubado apenas no anticorpo secundário (controles). Observa-se apenas a autofluorescência do órgão e a falta de marcação específica;

G-L) Lóbulos anterior (D1), mediano (D2) (**G-I**) e posterior (D3) (**J-L**) de insetos durante alimentação. **G-H)** Observar uma marcação linear e ramificada na região anterior de D1. Algumas ramificações seguem em direção a D2, mais evidente na região do hilo (h) (**H**). **J-K)** Observar a marcação em todo o D3, na forma de pontos fortemente marcados. Em **I** e **L**, o material foi incubado apenas no anticorpo secundário (controles). Observa-se apenas a autofluorescência do órgão e a falta de marcação específica.

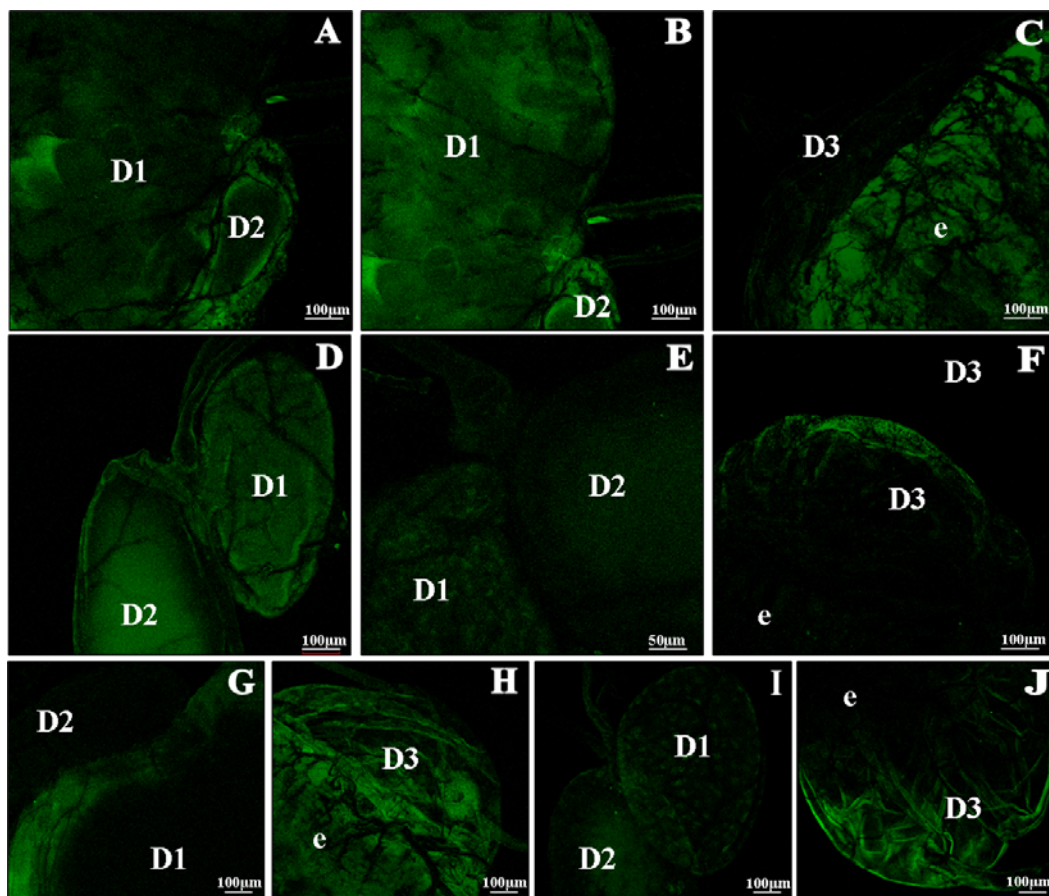


Figura 30 – Imunomarcção das fibras nervosas (anti- tirosina-hidroxilase) dos lóbulos salivares de *P. megistus* e *T. infestans*.

A-J) Lóbulos anterior (D1) (**A, D**), mediano (D2) (**B, E**) e posterior (D3) (**C, F**) de *P. megistus* (**A-C**) e *T. infestans* (**D-F**) durante alimentação. Não se observa marcação em nenhuma região dos lóbulos, assim como nos controles (**G-J**) das duas espécies (*P. megistus* [**G-H**] e *T. infestans* [**I-J**]).

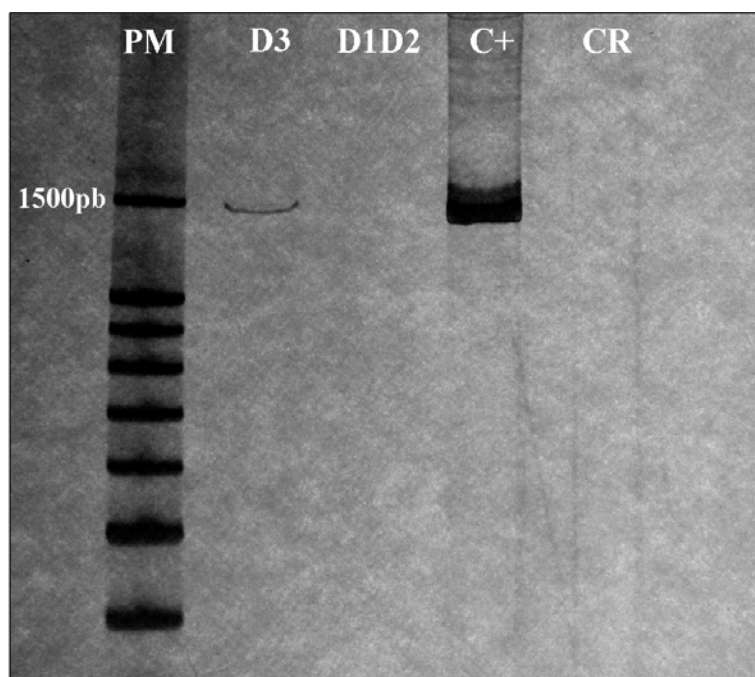


Figura 31 – Imagem do gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 2%, resultante da amplificação do gene universal bacteriano DNAr 16S.

PM = marcador de peso molecular em escada de 100pb (PROMEGA®); D3: lóbulo salivar posterior de *T. infestans*; D1D2: lóbulos salivares anteriores e medianos de *T. infestans*; C+: amostra de cultura de bactéria; CR: controle da reação. Barras: 100 μ m (A-D, F-J), 50 μ m (E)

6 Discussão

6.1 Caracterização morfológica da glândula salivar de *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans* durante o desenvolvimento pós-embrionário

As técnicas utilizadas permitiram a caracterização da glândula salivar dos triatomíneos após a eclosão. Para as três espécies utilizadas, a glândula se mostrou morfológicamente semelhante em todos os grupos analisados. O fato do triatomíneo apresentar o hábito hematófago durante todo o ciclo pode ter contribuído para que não ocorressem modificações estruturais na glândula salivar durante o seu desenvolvimento, mas apenas modificações que permitissem o crescimento do órgão. Em *R. prolixus*, a glândula salivar é formada por um par de lobos, cada um constituído por um par de lóbulos e ductos (acessório e principal) (Baptist, 1941). Em *P. megistus* e *T. infestans*, cada lobo é constituído por três lóbulos: o anterior, o mediano e o posterior (Barth, 1954). De acordo com Barth (1954), o volume glandular sofre constantes alterações de acordo com a atividade de alimentação do inseto e, assim, a glândula localiza-se no tórax, onde há espaço suficiente para o seu desenvolvimento. Cada lobo se encontra nas laterais do esôfago, ligado a ele por traquéias e nervos. Alguns autores consideraram cada lobo ou lóbulo como uma glândula (Baptist, 1941; Barth, 1954; Lacombe, 1999; Meirelles *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003; Anhê & Azeredo-Oliveira, 2008). Entretanto, como os canais salivares formam um canal único na região da cabeça, deve-se considerar anatomicamente e histologicamente que toda a estrutura seja uma única glândula, formada por dois lobos, cada qual constituído por duas (*R. prolixus*) ou três (*P. megistus* e *T. infestans*) unidades (os lóbulos).

Em *R. prolixus*, a secreção armazenada no lúmen do lóbulo principal se mistura a do acessório no hilo que, em seguida, divide-se nos ductos principal e acessório. O ducto principal leva a saliva até a região cefálica. De acordo com Santos e colaboradores (1997), o ducto acessório tem início da base do principal e se conecta ao trato digestivo. Assim, Meirelles e colaboradores (2003) sugeriram que parte da saliva seja liberada no esôfago, auxiliando na ingestão e/ou digestão do sangue.

Em *P. megistus* e *T. infestans*, a secreção dos três lóbulos também se mistura no hilo, porção dilatada entre os lóbulos D1 e D2. De acordo com Barth (1954) e Lacombe (1999), do

hilo surgem dois canais: o canal secundário, que traz a secreção de D3, e o canal salivar, que leva a saliva até a região cefálica. O canal secundário sai do hilo paralelamente ao canal salivar em direção à região cefálica. Ele entra na cabeça e muda sua direção em 180°, voltando pra trás em direção ao tórax e alcançando D3 (Barth, 1954; Lacombe, 1999).

Nas três espécies, os canais que levam a saliva até a região cefálica são denominados de canais salivares aferentes. Segundo Wenk e colaboradores (2010), o par de canais (um de cada lobo) se junta e desemboca na bomba salivar. Da bomba, o canal eferente dorsal leva a saliva até a maxila, de onde é liberada no hospedeiro. Os autores também mostraram que parte da saliva segue da bomba até o tubo labial pelo canal eferente ventral. Os autores sugeriram que ela seja liberada nos estiletos, para lubrificação dos movimentos e limpeza após o repasto (Wenk *et al.*, 2010).

Nas três espécies analisadas, os nossos dados mostraram que a glândula aumentou em média quatro vezes o seu tamanho inicial durante todo o ciclo de vida. Observou-se que o crescimento glandular aconteceu pelo aumento do volume celular e nuclear, pois o número de células não sofreu alteração durante o crescimento do inseto. Em túbulos de Malpighi de *R. prolixus*, Maddrell e colaboradores (1985) mostraram que o crescimento do órgão durante o ciclo de vida também aconteceu pelo aumento do tamanho celular. Os autores observaram que o conteúdo nuclear dobrou a cada ecdise (com exceção da última). As células dos túbulos de Malpighi são binucleadas e o aumento da ploidia aconteceu por endomitose. Os autores sugeriram que o crescimento do órgão sem divisão celular seja um mecanismo bem adaptado para prover, sem interrupção, a excreção necessária para o crescimento do inseto. Assim, com base nos nossos dados, podemos sugerir que o mesmo aconteça com a glândula salivar dos triatomíneos: a ausência de divisões celulares garante o intenso e constante metabolismo do órgão. Além disso, o aumento do tamanho do núcleo (e conseqüentemente da ploidia) possivelmente aconteça por endomitose (duplicação cromossômica sem divisão celular), como observado para túbulos de Malpighi.

Em glândulas salivares de outros artrópodes também já foi observado crescimento com ausência de divisão celular. Em bicho da seda (*Bombyx mori*), a glândula aumentou 1000 vezes o tamanho inicial durante o desenvolvimento; entretanto, o número de células foi o mesmo durante todo o ciclo de vida (330 células) (Parthasarathy & Gopinathan, 2005). Em carrapato (*Amblyomma americanum*), a glândula salivar de fêmeas aumentou 25 vezes durante a alimentação, mas o número de células também não foi alterado (Sauer *et al.*, 1995).

As técnicas utilizadas no presente trabalho permitiram uma observação detalhada das fibras musculares, fibras nervosas e traquéias. Durante todo o ciclo de vida do inseto, a

glândula se mostrou revestida por fibras musculares, formadas por filamentos paralelos de actina. Em D1, D2 e nos lóbulos principal e acessório, esse revestimento envolvia todo o órgão. Em D3, apenas algumas fibras musculares ramificadas foram observadas no lóbulo e elas não revestiam toda a sua estrutura. Revestimento muscular em glândula salivar também foi observado em outros triatomíneos (*R. domesticus*), em percevejos (*Cimex hemipterus*), na cigarrinha (*Mahanarva fimbriolata*) e na aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*) (Nunes & Camargo-Mathias, 2006; Serrão *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008). O ducto também apresentou revestimento por fibras musculares, traquéias e neurônios e, provavelmente, em *R. prolixus*, ele auxilia na contração e eliminação da saliva (devido ao seu grande calibre e intensa atividade das fibras nervosas durante o repasto).

As técnicas utilizadas mostraram uma grande quantidade de traquéias em toda a glândula. Elas promovem a intensa oxigenação de todo o órgão, necessária para a manutenção do intenso metabolismo glandular e da atividade muscular durante a secreção. Uma maior quantidade de traquéias ramificadas foi observada em D3, indicando metabolismo mais ativo (Lacombe, 1999).

As técnicas histológicas mostraram detalhes da organização estrutural das células glandulares, evidenciando diferenças entre os lóbulos de cada glândula. Em *R. prolixus*, a técnica de azul de Toluidina mostrou núcleos maiores e com maior área nucleolar no lóbulo principal, indicando metabolismo celular mais intenso. Além disso, as técnicas de azul de bromofenol e PAS mostraram diferenças na coloração dos lumens dos dois lóbulos, onde o principal se mostrou mais corado. Esses dados indicam diferenças na secreção armazenada e sugerem que o lúmen do lóbulo principal apresente maior concentração de proteínas totais (evidenciado pelo azul de bromofenol) e polissacarídeos neutros (PAS). Outra diferença observada foi a presença de vesículas de secreção apenas no lóbulo principal. Segundo Anhê e colaboradores (2007), o lóbulo principal apresentou atividade da enzima fosfatase ácida mais intensa que o lóbulo acessório, o que também foi associado ao seu metabolismo mais elevado. Meirelles e colaboradores (2003) sugeriram que, durante a evolução, triatomíneos do gênero *Rhodnius* tenham perdido o lóbulo posterior (D3), restando apenas o seu ducto, e que o lóbulo acessório seja parte do principal.

Em *P. megistus* e *T. infestans*, D1 apresentou núcleos maiores, com nucléolos numerosos e pequenos, sugerindo maior metabolismo. Este lúmen também apresentou coloração mais intensa para o PAS, indicando secreção com maior concentração de polissacarídeos neutros. Entretanto, os lumens de D1 de *P. megistus* e D2 de *T. infestans*

apresentaram-se mais corados pelo Azul de Bromofenol, indicando a presença de maior quantidade de proteínas totais nesses lóbulos.

O lóbulo posterior, em *P. megistus* e *T. infestans*, apresentou núcleos pequenos, com pequena área nucleolar e ausência de vesículas de secreção. Além disso, o lúmen não apresentou coloração em nenhuma das técnicas utilizadas (azul de Toluidina e Bromofenol, PAS).

Alguns autores sugeriram que, em Hemiptera, o lóbulo principal esteja associado à síntese protéica, enquanto o acessório (equivalente ao D3 de *P. megistus* e *T. infestans*) desempenhe a função de aumentar a quantidade de água e íons na saliva (Baptist, 1941; Barth, 1954; Miles, 1960, 1972; Miles & Slowiak, 1976; Serrão *et al.*, 2008). Isso justificaria seu metabolismo menos ativo (observado pelas características das células) e a ausência de coloração do lúmen. Barth (1954) indicou que D3 possui uma solução aquosa e com pouca quantidade de lipídios. Entretanto, segundo Lacombe (1999), a secreção produzida por D3 é liberada imediatamente e nunca estocada (como D1 e D2), estando sempre vazia. Além disso, a autora sugeriu não se tratar de um lóbulo que apenas dilua a saliva, visto que recebe intensa oxigenação das traquéias.

A marcação nuclear com DAPI e as técnicas histológicas mostraram núcleos grandes e poliplóides nos lóbulos, ploidia esta que aumentou com o crescimento do inseto. Poliploidia é um fenômeno comum em muitos tecidos de insetos, como intestino, epiderme, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, traquéia e folículo ovariano (Edgar & Orr-Weaver, 2001). Além dessa ploidia, os lóbulos mostraram células binucleadas durante todo o ciclo de vida. De acordo com Barth (1954), todo esse aumento de massa nuclear possibilitaria um intenso metabolismo, essencial para acelerar e regular a regeneração celular depois da secreção. Entretanto, enquanto alguns trabalhos indicaram a presença de células binucleadas (Baptist, 1941; Nussenzveig *et al.*, 1995; Anhê *et al.*, 2007; Anhê & Azeredo-Oliveira, 2008 [anexo 2]), outros sugeriram serem células em divisão celular (Meirelles *et al.*, 2003). Células binucleadas, com nucléolo evidente e cromatina descondensada também foram visualizadas no epitélio glandular do percevejo *C. hemipterus* (Serrão *et al.*, 2008).

Como já mencionado, a técnica de azul de Toluidina evidenciou uma grande área nucleolar, principalmente em D1 e no lóbulo principal. Estudos sugeriram que a área nucleolar esteja relacionada ao metabolismo celular, pois nucléolos fortemente ativos são volumosos (Nanya & Bicudo, 1995; Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Assim, como o tamanho e o número de nucléolos estão diretamente relacionados ao estado funcional da célula, os nossos dados sugerem que a grande área nucleolar se relacione ao elevado metabolismo

celular, necessário para produção da saliva. Esses dados confirmaram outros estudos, no qual foram descritos nucléolos numerosos inclusos em estruturas cromatínicas (Barth, 1954; Anhô & Azeredo-Oliveira, 2008 [anexo 2]). Além disso, Anhô e colaboradores (2007) mostraram atividade fosfatásica ácida nos nucléolos, relacionando esta enzima à transcrição de moléculas de RNAr, provavelmente, no centro fibrilar nucleolar.

A técnica de Azul de Toluidina mostrou o citoplasma fortemente metacromático em D1D2 e no lóbulo principal. Esses dados sugerem a presença de RNAs citoplasmáticos (RNAm, RNAt e RNAr), o que reflete na alta síntese protéica. A ultraestrutura da glândula salivar de *Rhodnius domesticus* e *T. infestans* mostrou que as células são ricas em retículo endoplasmático e mitocôndrias (Reis *et al.*, 2003; Meirelles *et al.*, 2003).

A análise ultraestrutural de glândulas fraturadas das três espécies mostrou que a região apical das células glandulares é formada por dobras de membrana. Essas dobras estão associadas ao aumento da área de secreção, permitindo uma difusão mais rápida e translocação passiva dos componentes da saliva, indicando secreção do tipo merócrina (Meirelles *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003). Nussenzweig e colaboradores (1995) sugeriram que este seja o mecanismo de liberação do óxido nítrico para o lúmen em *Rhodnius*.

Além da secreção merócrina, secreção apócrina foi confirmada pela presença de vesículas esféricas entremeadas às dobras de membrana. Essas vesículas foram observadas no lóbulo principal de *R. prolixus* e em D1 e D2 de *P. megistus* e *T. infestans*. Detalhes ultraestruturais em *R. prolixus* mostraram que a maioria das vesículas estava aberta e, no seu interior, vesículas pequenas foram observadas. Isso sugere que vesículas pequenas se juntam em uma vesícula maior, que é secretada para o lúmen. Em outros hemípteros, alguns trabalhos têm mostrado secreção do tipo apócrina e merócrina, como em *T. infestans* (Reis *et al.*, 2003) e *C. hemipterus* (Serrão *et al.*, 2008), ou apenas merócrina em *R. domesticus* (Meirelles *et al.*, 2003).

Ocasionalmente, algumas colorações histológicas de adultos de *R. prolixus* mostraram células inteiras ou em estado característico de apoptose no lúmen. Estas células poderiam estar associadas à secreção do tipo holócrina ou se relacionariam a um possível mecanismo do envelhecimento, visto que foram observadas apenas em adultos após alimentação.

No ducto de *R. prolixus*, também foi visualizado revestimento interno por dobras de membrana. Em baratas (*P. americana*), Just e Walz (1994) mostraram que esse revestimento estava associado à modificação da saliva primária. Rocha e colaboradores (2010) cultivaram células do ducto em meio de cultura e observaram a presença de vesículas secretoras,

sugerindo possível papel secretor. Em nossas observações, vesículas não foram visualizadas no ducto.

Assim, os nossos dados apresentaram uma caracterização morfológica e ultraestrutural da glândula salivar das três espécies de triatomíneos. Durante todo o ciclo de vida pós-embrionário foi observado um crescimento de quatro vezes e a glândula se manteve morfológicamente semelhante.

6.2 Caracterização da inervação da glândula salivar de *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans* durante o desenvolvimento pós-embrionário

As técnicas utilizadas permitiram a visualização e a caracterização dos aspectos da inervação da glândula salivar das três espécies estudadas.

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou, em *R. prolixus*, a presença de um nervo que acompanhava o ducto, alcançava o lóbulo acessório e se ramificava no principal. Também foi visualizado outro nervo, que partia do esôfago e alcançava a região lateral-posterior do lóbulo principal, onde se ramificava. Em *P. megistus* e *T. infestans*, apenas um nervo foi observado. Ele acompanhava o canal salivar e se ramificava nos lóbulos. De acordo com a literatura (Insausti, 1994; Orchard, 2006), a glândula salivar é inervada pelo sistema nervoso central e estomogástrico. Pelo sistema nervoso central, o nervo salivar surge da base do nervo labial, acompanha os ductos e se ramifica nos lóbulos. Pelo sistema estomogástrico, o nervo esofágial envia ramificações do esôfago à glândula (Insausti, 1994; Orchard, 2006). Os nossos resultados mostraram os dois nervos (salivar e esofágial) alcançando a glândula de *R. prolixus*, e apenas o salivar chegando na glândula de *T. infestans* e *P. megistus*.

As imunomarcações contra células nervosas (contra serotonina, dopamina e tirosina-hidroxilase) mostraram diferenças na intensidade e no local de marcação entre as espécies analisadas.

Atividade serotoninérgica foi observada nas glândulas de *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans*. Ela apresentou maior intensidade e local de marcação nos insetos durante alimentação.

Em *R. prolixus* durante alimentação, atividade serotoninérgica foi observada em todo o lobo (ductos e lóbulos). No lóbulo principal, o nervo salivar foi visualizado como uma marcação linear que se ramificava a partir da região mediana.

Em *P. megistus*, foi observada uma atividade mais intensa que se ramificava na região mediana de D1. Trata-se do nervo salivar. Em *T. infestans*, a atividade foi menos intensa e se ramificava a partir da região anterior de D1. É provável que este nervo seja o nervo esofágico que se ramifica do esôfago no lóbulo. Em ambas as espécies, D2 apresentou atividade serotoninérgica apenas durante a alimentação. A região do hilo apresentou intensa atividade serotoninérgica durante a alimentação. Isso, provavelmente, aconteceu por se tratar da região onde a saliva dos três lóbulos se mistura.

Intensa atividade serotoninérgica foi observada em D3. Este lóbulo se apresentou fortemente marcado em toda a sua estrutura, sendo um órgão extremamente ativo durante alimentação. Esses dados concordam com Lacombe (1999), que afirmou se tratar de um órgão de intensa atividade. Entretanto, contrariam a hipótese da mesma autora (Lacombe, 1999), pois ela sugeriu que a secreção produzida por D3 seja liberada imediatamente após a secreção e nunca estocada. Em D3, os nossos dados também mostraram uma marcação linear sobre o canal secundário. De acordo com Insausti (1994), corresponde ao nervo salivar que acompanha o canal e se ramifica no lóbulo. Trata-se, portanto, de um nervo serotoninérgico.

De acordo com Orchard (2006), a serotonina aumenta o conteúdo do AMP cíclico e a frequência e amplitude das contrações de maneira dose-dependente. Assim, a maior atividade serotoninérgica observada nas glândulas de insetos durante alimentação está diretamente relacionada à maior frequência e amplitude das contrações musculares, permitindo a liberação da saliva.

Entretanto, quando *R. prolixus* foi estimulado a alimentar, o lóbulo principal apresentou uma marcação linear em toda a sua estrutura. Isso pode indicar que, apesar da saliva ser liberada apenas após a picada (durante a fase de sondagem) (Soares *et al.*, 2006), o estímulo da alimentação faz com que a glândula comece a se contrair e a se preparar para o repasto. Esse preparo pode incluir contrações que misturem o conteúdo salivar, assim como potencializar a compressão da saliva, estimulando a sua liberação (Orchard & Brugge, 2002).

Em *Aedes aegypti* foi demonstrada a importância da serotonina durante o período de sondagem e durante todo o processo de alimentação (Novak *et al.*, 1995). Nesta espécie, a atividade serotoninérgica foi encontrada apenas nas fêmeas e, assim, foi relacionada ao hábito hematófago (visto que o macho se alimenta de seiva). Na mosca *Calliphora erythrocephala*, estudos mostraram que a serotonina atua como neurohormônio, promovendo o aumento da salivação de maneira dose-dependente (Berridge & Patel, 1968), ativando as correntes de potássio e cloreto (Berridge *et al.*, 1975) e aumentando os níveis de AMP cíclico (Heslop & Berridge, 1980).

Os ductos de *R. prolixus* durante o repasto apresentaram atividades de serotonina, dopamina e tirosina-hidroxilase. Atividade dopaminérgica em ductos de glândulas salivares já foi descrita em barata *P. americana* (Lang & Walz, 1999) e de tirosina-hidroxilase no bicho pau *C. morosus* (Ali & Orchard, 1996a). Os autores sugeriram que essas substâncias (dopamina e tirosina-hidroxilase) atuem na modificação da saliva primária (absorção e eliminação de íons). Atividade serotoninérgica em ducto de *R. prolixus* foi anteriormente demonstrada por Orchard (2006). Assim, a intensa atividade de serotonina, dopamina e tirosina-hidroxilase observada no ducto de *R. prolixus* pode estar associada a algum papel do ducto de modificação da saliva. Essa atividade dos neurotransmissores, associada ao revestimento por fibras musculares, sugere, ainda, que o ducto se contraia durante a hematofagia, auxiliando na liberação da saliva.

De acordo com Just e Walz (1996), inervações serotoninérgicas e dopaminérgicas estimulam secreções de diferentes tipos na glândula salivar de *P. americana*. Os autores observaram que, enquanto serotonina estimulou liberação de saliva rica em proteína, a dopamina foi necessária para produção de saliva sem proteína, resultando em uma saliva mais diluída. Isto aconteceu porque a dopamina atuou nas células periféricas e do ducto, enquanto a serotonina estava presente nas células centrais do ácino (Just & Walz, 1996; Marg *et al.*, 2004). Além disso, dopamina mostrou uma atividade secretora mais elevada, com menor limiar (Just & Walz, 1996). Entretanto, os autores não afirmaram que um neurotransmissor fosse mais importante que outro, pois cada um atuou em uma região específica (Lang & Walz, 1999).

Ali e colaboradores (1993) descreveram a presença de dopamina e serotonina nas glândulas salivares do gafanhoto *L. migratória*, aumentando os níveis de AMP cíclico de maneira dose-dependente (Ali *et al.*, 1993). Ambas apresentaram curvas dose-resposta semelhantes na elevação do AMP cíclico, embora serotonina apresentasse um menor limiar (10^{-10} mol/L, contra 10^{-9} mol/L da dopamina) (Ali *et al.*, 1993).

Durante o repasto em *R. prolixus*, os nossos resultados também mostraram atividade de tirosina-hidroxilase nos músculos da região mediana e no lóbulo acessório. Trata-se de uma enzima da via de formação das catecolaminas. Como epinefrina e norepinefrina são ausentes ou encontradas em pequenas quantidades em insetos (Evans, 1980), tirosina-hidroxilase é indicativo da presença de dopamina. Entretanto, não foi observada atividade dopaminérgica na camada muscular da região mediana e no lóbulo acessório, sugerindo a presença de outra catecolamina nas regiões marcadas. Nas glândulas salivares de *P. megistus*

e *T. infestans*, atividade de tirosina-hidroxilase e de dopamina não foram observadas, sugerindo a ausência de atividade das catecolaminas.

Assim, de modo geral, os resultados mostraram que os neurotransmissores (serotonina e dopamina) e a enzima (tirosina-hidroxilase) (apenas em *R. prolixus*) são importantes no processo de alimentação, visto que em insetos em jejum a atividade esteve ausente ou foi observada em pequena quantidade. Entretanto, estudos quantitativos precisam ser realizados a fim de elucidar os limiares de atuação, a possível liberação de diferentes secreções e as funções no ducto (apenas para *R. prolixus*).

6.3 Detecção das bactérias presentes no lóbulo posterior de *T. infestans*

Os cortes histológicos e as eletromicrografias do lóbulo posterior de *T. infestans* mostraram a presença de bactérias no seu lúmen. Este resultado foi confirmado pela amplificação do fragmento de DNAr 16S.

Em 1993, Hypša já havia descrito a presença de endossimbiontes em vários órgãos de *T. infestans*, principalmente na glândula salivar e no sistema nervoso central. Posteriormente, essa bactéria foi isolada da hemolinfa, cultivada e identificada como *Arsenophonus triatominarum*, baseada em análise de sequências do DNAr 16S (Hypša & Dale, 1997). Os autores caracterizam esta bactéria como intracelular, Gram-negativa e que apresenta formas esféricas e filamentosas (Hypša & Dale, 1997). Todas essas características coincidem com as observadas no nosso trabalho. Além disso, os nossos resultados mostraram a presença de outra bactéria no lóbulo posterior, não descrita na literatura até o momento. Esta bactéria se apresentou Gram-positiva e formato esférico.

Em ninfas de primeiro estágio, não foram observadas bactérias na glândula salivar. De acordo com Hypša (1993), a transmissão é transovariana e ninfas de primeiro estágio apresentam as bactérias apenas no intestino. Elas se dispersam para os outros órgãos após o repasto e ecdise.

Hypša (1993) descreveu a presença da bactéria nos três lóbulos e no interior dos ductos. Entretanto, em nossas análises de microscopia de luz e eletrônica de varredura, a bactéria esteve presente apenas em D3. Esse dado foi confirmado pela PCR, já que a banda da amplificação do DNAr 16 foi revelada apenas em D3.

Quando os três lóbulos são comparados, D3 recebe uma maior oxigenação, por ser revestida por grande quantidade de traquéias. Outra característica que diferencia D3 dos

outros lóbulos é a natureza da solução armazenada no seu lúmen: aquosa e com poucos lipídeos (Barth, 1954). Essas características podem favorecer a presença da bactéria em D3.

As nossas análises dos cortes histológicos mostraram infecções maciças das bactérias dentro das células, ocupando quase todo o citoplasma. De acordo com Hypša e Dale (1997), as bactérias se multiplicam dentro das células por septação e rompem a membrana plasmática para serem liberadas. Apesar dos autores indicarem que, mesmo em infecções maciças, nenhum prejuízo tenha sido observado (Hypša, 1993), a grande quantidade de bactérias intracelulares sugere um possível dano e, assim, mais estudos precisam ser realizados.

Bactérias do gênero *Arsenophonus* foram identificadas em vários grupos de artrópodes além dos triatomíneos (Hypša, 1993; Hypša & Dale, 1997), tais como vespas parasitóides (Gherna *et al.*, 1991), carrapatos (Grindle *et al.*, 2003), mosca branca (Thao & Baumann, 2004), pulgões (Tsuchida *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003), psilídeos (Subandiyah *et al.*, 2000) e em mosca de pombo (Dale *et al.*, 2006). Entretanto, atualmente, pouco se conhece sobre o contexto de simbiose nesses insetos.

Assim, os resultados mostraram a presença de pelo menos dois tipos de bactérias no lóbulo posterior de *T. infestans*, dos quais apenas um se mostrou semelhante ao citado pela literatura. As bactérias são eliminadas pela salivagem e ocupam grande parte do citoplasma das células epiteliais. Trata-se de um assunto ainda pouco conhecido pela literatura e, portanto, novos estudos precisam ser realizados, a fim de compreender o papel dessas bactérias no lóbulo posterior, se são endossimbiontes ou causam danos às células e os fatores que determinam a presença do microrganismo apenas no lóbulo posterior.

7 Conclusões

- A glândula salivar se mostrou morfológicamente semelhante durante todo o ciclo de vida nas três espécies analisadas.

- Durante o ciclo de vida das três espécies analisadas, a glândula salivar cresceu em média quatro vezes o seu tamanho inicial. O crescimento glandular aconteceu pelo aumento do tamanho celular, pois o número de células se manteve constante.

- Nas três espécies analisadas e durante todo o ciclo de vida, a glândula salivar se mostrou revestida por fibras musculares formadas por filamentos paralelos de actina, responsáveis pela contração glandular e ejeção da saliva. Associadas a essas fibras, uma grande quantidade de traquéias foi observada. Elas promovem a intensa oxigenação de todo o órgão, necessária para a manutenção do intenso metabolismo glandular e da atividade muscular durante a secreção.

- Núcleos maiores e com maior área nucleolar foram observados nos lóbulos principal (*R. prolixus*) e anterior (*P. megistus* e *T. infestans*), indicando células com metabolismo mais ativo.

- Núcleos grandes e volumosos e citoplasma metacromático foram visualizados nas células glandulares, características de células com metabolismo fortemente ativo.

- Vesículas de secreção e dobras de membrana, características dos tipos de secreção apócrina e merócrina, respectivamente, foram observadas nos lóbulos principal (*R. prolixus*), anterior e mediano (*P. megistus* e *T. infestans*).

- Em *R. prolixus* adultos, células inteiras ou em estado característico de apoptose no lúmen foram observadas no lúmen do lóbulo principal. São características de secreção do tipo holócrina ou estariam relacionadas a um possível mecanismo do envelhecimento.

- Atividade serotoninérgica foi observada nas glândulas salivares de *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans*. Ela apresentou maior intensidade e maior número de marcações nos insetos durante alimentação.

- Intensa atividade serotoninérgica foi observada no lóbulo posterior de *T. infestans* e *P. megistus*, indicando se tratar de um órgão fortemente ativo durante o repasto sanguíneo.

- Atividade serotoninérgica foi observada quando *R. prolixus* foi estimulado a alimentar, indicando que, apesar da saliva ser liberada apenas após a picada, o estímulo da alimentação faz com que a glândula comece a se contrair e a se preparar para o repasto.

- Atividade dopaminérgica e de tirosina-hidroxilase foi observada apenas na glândula de *R. prolixus* durante alimentação.

- A intensa atividade dos neurotransmissores observada durante o repasto e o revestimento muscular do ducto salivar de *R. prolixus* indicam que ele se contraía durante a hematofagia, auxiliando na liberação da saliva.

- Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são encontradas no lóbulo posterior de *T. infestans* e são eliminadas pela saliva durante a alimentação.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 – Artigo no prelo

Salivary Glands of *Rhodnius prolixus*: Morphological Characterization During All Life Cycle

Ana Carolina Borella Anhô, Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR – FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil.

Abstract

Rhodnius prolixus is an important vector of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. It is hematophagous during all life cycle. During the bite, it secretes a saliva that antagonizes hemostatic, inflammatory and immunological systems imposed by the vertebrate host. In order to understand gland structure, a study of the organ growth was carried out with nymphs and adults of *R. prolixus*. The dissected glands were processed for Light microscopy (LM), Fluorescence Microscopy (MF), Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) and Scanning Electron Microscopy. For LM, glands were stained with Toluidine blue, Periodic Acid Schiff (PAS) (polysaccharide staining) and Bromophenol blue (protein staining). For FM, glands were incubated with rhodamine-phalloidin (actin labeling) and DAPI (nuclear marker). Glands incubated with antibodies against nerve cells were analyzed using LSCM. The results indicate that the gland is very similar during all cycle and it is formed by two pairs of lobules and ducts. A single layer of bi-nucleated cells covers a large central lumen. PAS and Bromophenol Blue show a higher staining of the principal lobule, suggesting a higher concentration of polysaccharide and protein in it. Transversal muscle layers cover the entire gland and they are responsible for gland contraction and saliva releasing. Apocrine, merocrine and holocrine types of secretion are visualized. In insects during feeding, the whole gland is surrounded by a meshwork of serotonergic-branched fibers. Dopaminergic activity is observed just in the duct. Activity of tyrosine-hydroxylase is visualized in the muscle layers in the middle of the gland and in the accessory lobule.

Keywords: *Rhodnius prolixus*, salivary gland, ultrastructure, histology.

1. Introduction

Triatomines are vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas Disease. In Latin America, it has been estimated that there are 15–17 million people infected by this protozoon and 90–100 million are exposed to infection (Coura and Borges-Pereira, 2010). These insects, especially *Rhodnius* genus, are vector of other protozoa: *Trypanosoma rangeli*. This protozoon is apparently harmless to humans but can be pathogenic to the insect vector (Hecker et al., 1990). It is transmitted by the bite.

Triatomines are haematophagous insects in all life stages (five nymphal stages and adults). During entire blood meal (probing and engorgement phases), salivation occurs (Soares et al., 2006). This saliva, in association with cryptic behavior, nocturnal habits of triatomines and mechanical adaptations of mouthparts, allows few perceivable bites thus enabling high efficiency during blood meal.

This saliva is produced by a salivary gland located in the thorax. In *Rhodnius* genus, salivary gland is formed by two close and independent units: the larger is reddish and elongated (principal unit) and the smaller is round and translucent (accessory unit) (Reis et al., 2003). Ultrastructural analysis showed abundant endoplasmic reticulum, mitochondria and microvilli in the apical plasma membrane domain, thus enlarging the membrane area available for saliva secretion (Reis et al., 2003). In addition, an intense acid phosphatase activity was found in nucleolus, suggesting the activity of this enzyme during rRNA molecule transcription (Anhê et al., 2007).

Recently, Rocha and collaborators (2010) maintained a primary culture of *R. prolixus* salivary gland cells. Three types of cells were identified, mostly bi-nucleated ones. In addition, some secretion vesicles were observed budding from duct cells, suggesting a possible secretory role of this structure.

Despite its importance, the morphology of salivary gland is little known. So, in the present study, we have combined conventional staining methods with laser confocal and scanning electron microscopies, in order to create better understand of salivary gland structure of *R. prolixus*. The study was carried out with nymphs (first to fifth instars) and adults (males) of *R. prolixus* to understand salivary gland growth. In addition, unfed and fed insects were used, in order to analyze and compare the glands after blood feeding.

2. Material and Methods

2.1. *Rhodnius prolixus*

The triatomines were provided by the Insectary of the Laboratory of Triatomines and Epidemiology of Chagas Disease (CPqRR - FIOCRUZ). The insects were maintained in a

well established colony from Honduras, at controlled temperature (26°C) and humidity (55%). Unfed (seven days after ecdysis) and fed (seven days after blood meal) nymphs (first to fifth instars) and adults (males) were used. In some experiments, other two groups of insects were used: insects with stimulated blood meal and during blood meal. In the first, an anesthetized mouse was offered to the insect. The triatomine was dissected as soon as it tried to feed. In the second group, the feeding in the anesthetized mouse was interrupted and the gland immediately dissected and fixed.

2.2. Dissection of salivary glands

Insects were anaesthetized on ice. Under a stereoscope and using fine needles, the thorax was hold and the head pulled off. Exposed salivary glands were washed into phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and processed for the microscopies.

2.3. Scanning electron microscopy (SEM)

The glands were fixed overnight at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer pH 6.8. After, glands were post-fixed with 2% osmium tetroxide solution plus 1.6% potassium ferrocyanide for 2h. After dehydration with increasing acetone concentrations (30–100%), the samples were dried by the critical point device with CO₂ (Secundino et al., 2005). Some dried glands were fractured for visualization of the secretory surface. Then, the glands were mounting in SEM stubs, coating with gold particles in a sputtering and analyzing in a JEOL 5600 SEM (Tokyo, Japan).

2.4. Laser Scanning Confocal (LSCM) and Fluorescence Microscopy (FM)

The glands were fixed at 8°C with 4% formaldehyde pH 6 for 2h, washed in RPMI medium for 2h and PBS/BSA (PBS with 0.1% of bovine serum albumin) for 30 minutes. Then, the samples were processed as following:

- **Rhodamine/phalloidin and DAPI:** glands were incubated in rhodamine/phalloidin (Molecular probes, dilution 1: 1000) for 24h and in DAPI (Sigma, dilution 1: 1000) for 30 min. For control, glands were incubated with PBS.

- **Antibodies against nerve cells:** glands were incubated overnight with the primary antibody against serotonin, tyrosine-hydroxylase or dopamine (Sigma, dilution 1: 1000 in PBS/BSA 1%). Then, glands were washed in PBS/BSA 1% and incubated with the secondary antibody for 2h (dilution 1: 100 with AC Dako; anti-rabbit-FITC for serotonin and tyrosine-

hydroxylase; anti-sheep-FITC for dopamine). Control group were incubated with secondary antibody.

After labeling, the samples were washed several times in PBS and mounted with mowiol (Sigma Aldrich #32, 459-0) for analysis in a microscope Zeiss LSM 510 (Konigsallee, Gottingen, Germany).

2.5. Light Microscopy (LM)

The glands were fixed overnight at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer pH 6.8. Then, they were dehydrated with increasing concentrations of ethanol (30-100%) for 10 minutes each. After embedding in Histo-resin (Leica, Microsystems Nussloch/Heidelberg) overnight and polymerization at room temperature, 1µm sections were cut using a microtome (Micron HM 340 E) (Walldorf, Germany). Stains were performed with Toluidine Blue, Periodic Acid of Schiff (PAS) and Bromophenol blue. The stained samples were examined and photographed in Zeiss LSM 510 (Konigsallee, Gottingen, Germany).

3. Results

Scanning electron microscopy reveals that salivary gland is very similar during life cycle, since it is formed by a pair of lobes, each one composed by two lobules (accessory and principal) and two ducts (accessory and main). Gland grows four times during the cycle (Fig. 1A, B). Principal lobule is elongated, unilobulated and at the median region is located the accessory lobule and the bases of the ducts (Fig. 1B). The accessory lobule is smaller and rounded (Fig. 1C). Transversal muscle fibers cover the lobules and ducts (Fig. C, E). A lot of tracheas are also observed (Fig. 1C). Some fractured ducts show a canal that divides in the two ducts (Fig. 1F) and membrane infoldings inside it (Fig. 1G). In addition, two nerve cords are visualized in the gland. One nerve arrives from the duct to the accessory lobule and ramifies in the muscle fibers of the principal lobule (Fig. 1G). The other arrives from the esophagus to the posterior region of the principal lobule (Fig. 1H).

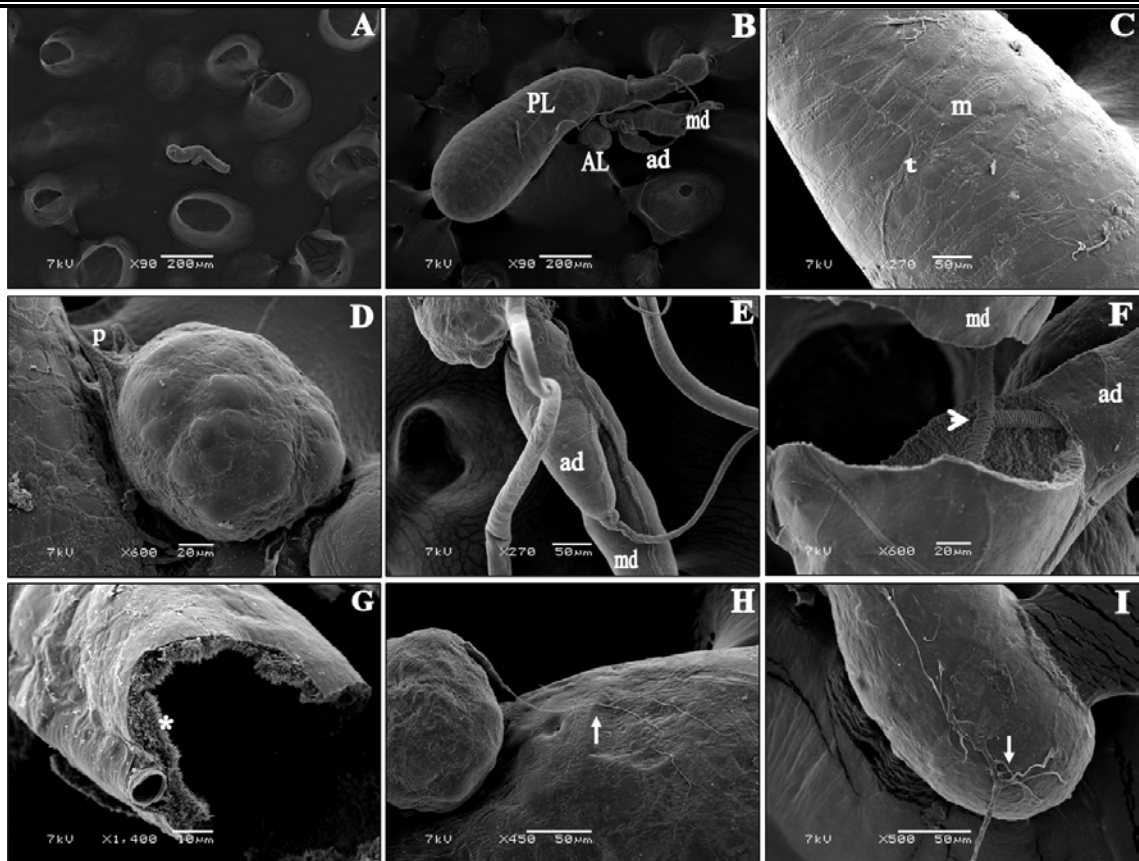


Figure 1: SEM images of salivary gland of *R. prolixus*. A-B) General view of gland of first nymph (unfed) (A) and adult (fed) (B), showing the principal (PL) and accessory lobules (AL), main (md) and accessory ducts (ad); C-E) Details of principal lobule (C), accessory lobule (D) and ducts (E); F) Fractured ducts showing the hylum dividing in the two ducts (F) and the membrane infoldings (*) (G); H-I) Detail of innervations (arrows) arriving by the accessory lobule (H) and the posterior region (I) of the principal lobule.

Some glands were fractured to analyze their internal surfaces. The secretory epithelium is composed by cells with very regular aspect, mainly hexagonal shapes (Fig. 2A, B). A large number of membrane infoldings are present in the apical surface (Fig. 2C). Among these infoldings, many secretory vesicles are visualized (Fig. 2B, C). Most of them are opened and with some small vesicles inside (Fig. 2C).

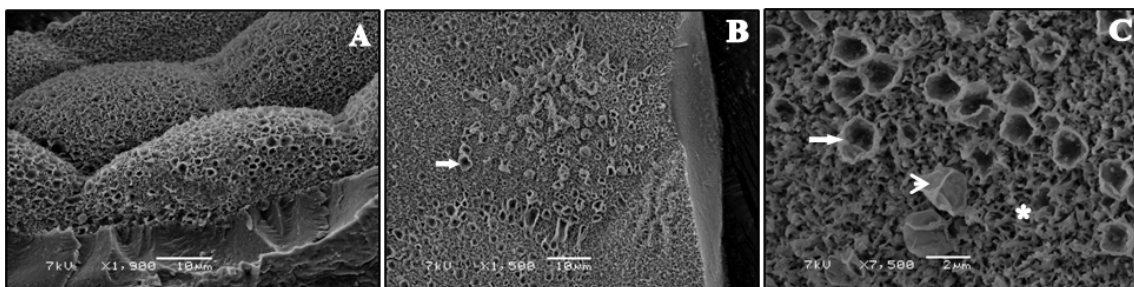


Figure 2: SEM images of fractured salivary gland of *R. prolixus*. A) Details of the epithelium showing the regular aspect and mainly hexagonal shapes of the cell surfaces; B) Detail of the secretory cell surface showing a lot of vesicles (arrow); C) High magnification view showing several opened (arrow) and closed (arrowhead) secretory vesicles on the cell surface. Note the presence of small vesicles inside the big ones (arrow) and the membrane infoldings (*).

Histological analysis of the glands showed that lobules are formed by a single epithelium that covers a large lumen, where saliva is stored (Fig. 3). Toluidine Blue staining shows bigger and bi-nucleated cells in the principal lobule, with bulky nuclei and a large nucleolar area (Fig. 3C, F). A lot of vesicles are observed during secretion to the lumen (Fig. 3B, C). In addition, the number of nucleolar corpuscles increases during the cycle (Fig. 3C, D, E, F). Comparing the two lobules, the accessory shows smaller cells with less nucleolar corpuscles (Fig. 3B, E). No secretory vesicles are observed. Both lobules show a metachromatic cytoplasm. The ducts showed very small and rounded cells, with just one nucleolar corpuscle (Fig. 3B, E). Secretions from the two lobules mixture in the hilum, which ramifies in the two ducts (accessory and main) (Fig. 3B, E).

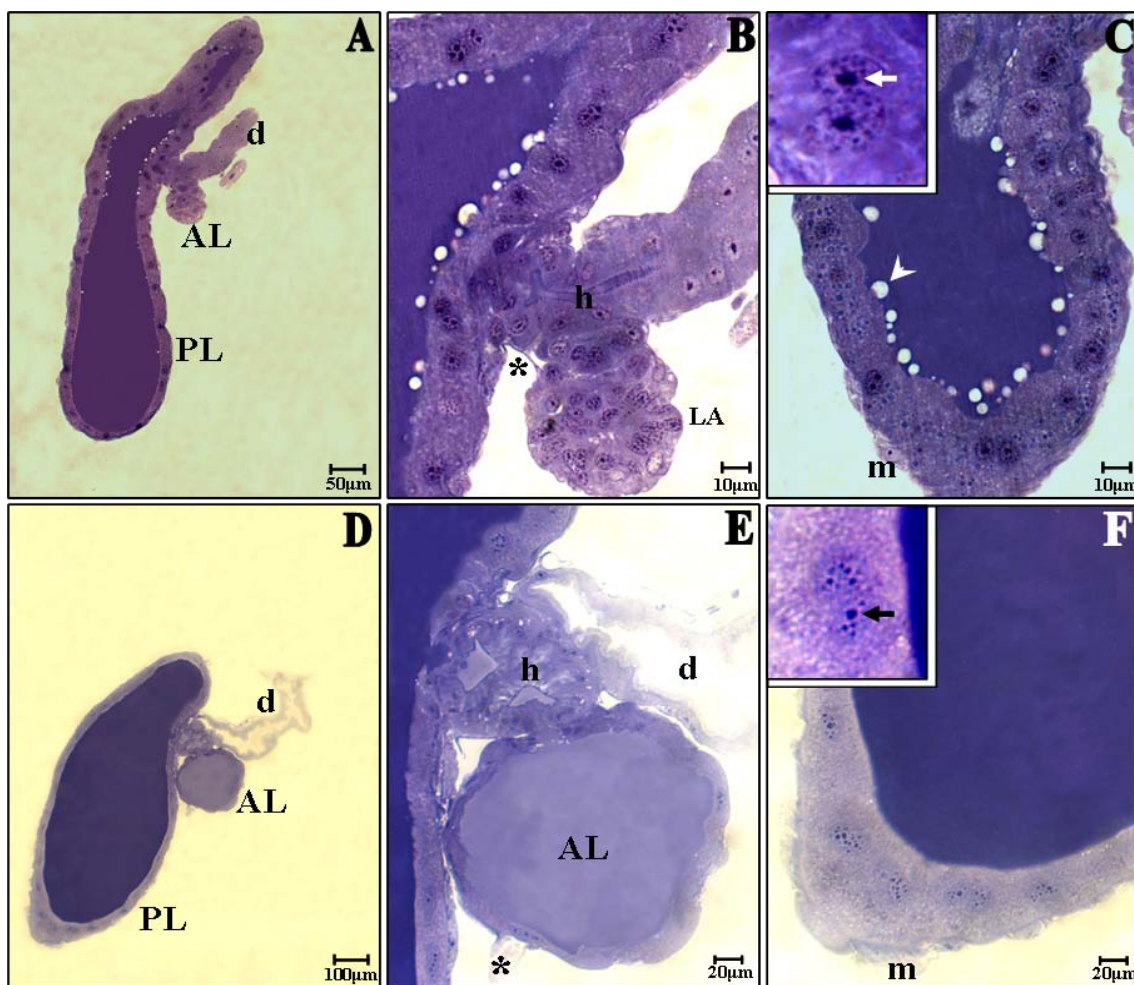


Figure 3: Histological sections of the salivary gland of first nymph (A-C) and adult (D-F) *R. prolixus* after staining with Toluidine Blue. A, D) General view, showing the principal (LP), accessory lobule (AL) and ducts (d); B, E) Detail of accessory lobule and duct, showing the hilum (h) and the projection (*); C, F) Detail of principal lobule, showing some secretory vesicles (arrowheads) and the muscle fibers (m). Insets show high magnification of the principal lobule cells, revealing the nucleolar corpuscles (arrows).

Some entire cells are observed in the lumen of adult glands (Fig. 4). In addition, Toluidine Blue (Fig. 3D, E, F), Bromophenol Blue (Fig. 5A, B, C) and PAS (Fig. 5D, E, F) show a stronger staining of the principal lobule than the accessory one.

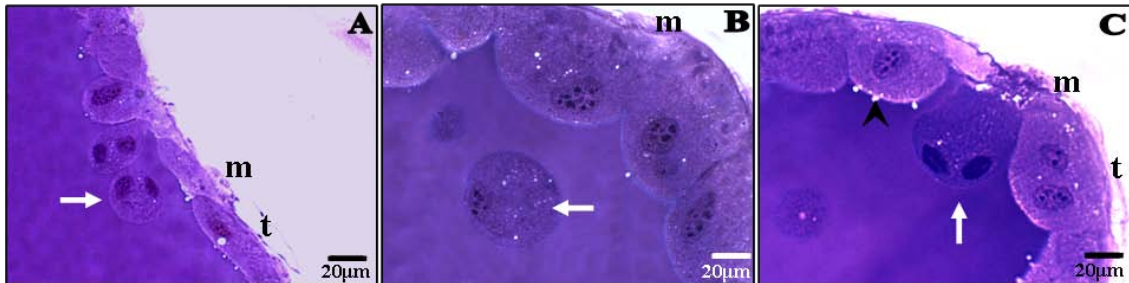


Figure 4: Histological sections of the salivary gland of fed adult *R. prolixus* after staining with Toluidine Blue. Details of cells (arrows) during releasing to the lumen of the principal lobule. Muscles fibers (m), trachea (t) and secretory vesicles (arrowhead) are also visualized.

Fluorescence microscopy of the salivary glands labeled by rhodamine/phalloidin shows that the muscle fibers cover the entire gland (Fig. 6A, B, C, D). They are composed by parallel actin filaments (Fig. 6E). In detail, glands labeled by DAPI reveal a similar number of cells in the principal lobule during the cycle (about 470) (data not shown). In addition, nuclei grow four times (data not shown).

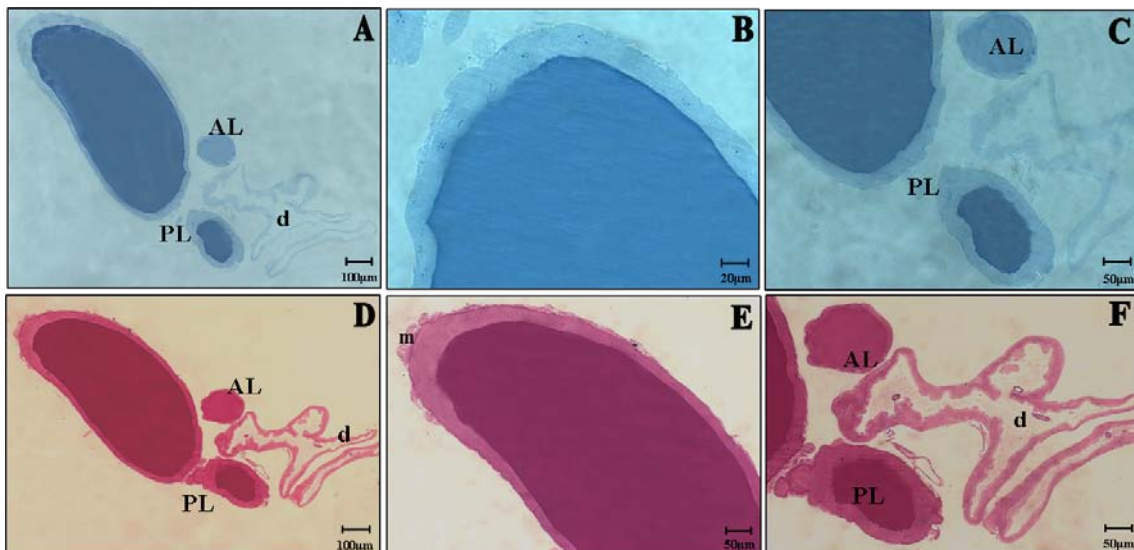


Figure 5: Histological sections of the salivary gland of adult *R. prolixus* after staining with Bromophenol Blue (A-D) and PAS (E-H). A, D) General view of the principal (PL) and accessory lobule (AL) and ducts (d); B, E) Detail of principal lobule; C, F) Details of accessory lobule and duct (d).

Laser scanning confocal microscopy was used to analyze glands labeled with antibodies against nerve cells. The analysis shows that, in unfed and fed insects, serotonergic activity is observed along the entire duct (Fig. 7A). No activity of tyrosine and dopamine is

observed (data not shown). However, in insects with stimulated blood meal, serotonergic activity is observed as linear fibers in the principal lobule (Fig. 7B). A more intense activity occurs in the duct (Fig. 7C).

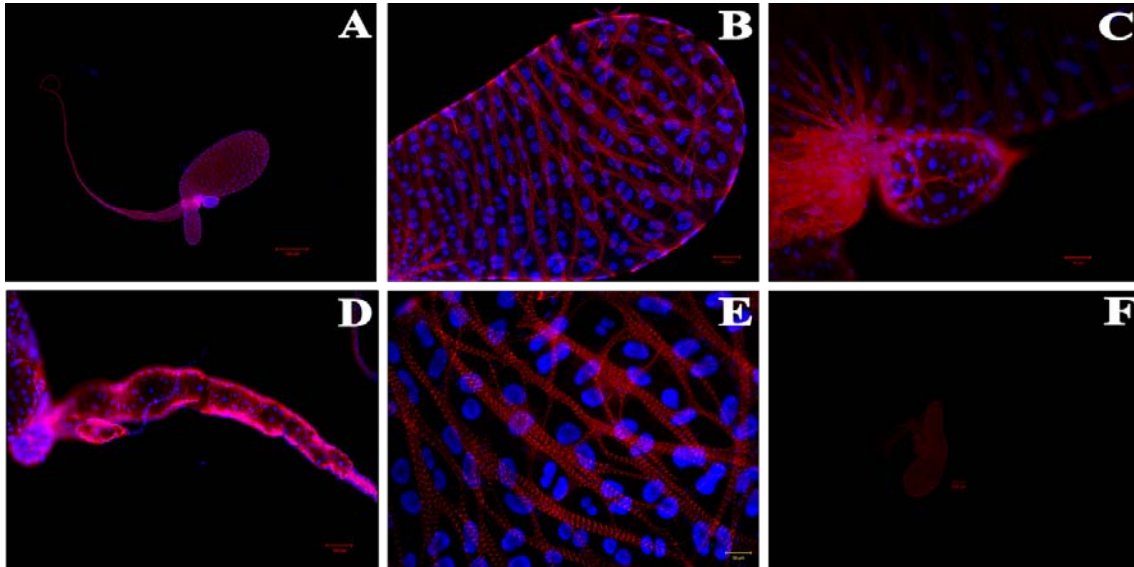


Figure 6: Salivary gland of *R. prolixus* labeled by rhodamine-phalloidin (red) and DAPI (blue). **A)** General view; **B-D)** Details of principal lobule (**B**), accessory lobule (**C**) and ducts (**D**); **E)** Detail of **B**, showing the muscle fibers composed by parallel filaments of actin (red) and the two nuclei of each cell (blue); **F)** Control group (just fixed). Bars: **A:** 500 μ m, **B, D:** 100 μ m; **C, E:** 50 μ m; **F:** 200 μ m.

During blood meal, the whole salivary gland is surrounded by a meshwork of serotonergic branched fibers (Fig. 7D, E). Activity of tyrosine-hydroxylase is found on the muscle layers in the middle of the gland and accessory lobule (Fig. 7J, K). The duct shows activity of serotonin (Fig. 7E), tyrosine-hydroxylase (Fig. 7J) and dopamine (Fig. 7H).

Some glands of insects during blood meal were incubated with both phalloidin/rhodamine (for actin labelling) and anti-serotonin (against nerve cells) (data not shown). This analysis revealed that the serotonergic fibers accompany the muscle fibers.

Glands of the control group (incubated just with the secondary antibody) show a total lack of specific activity (Fig. 7F, I, L).

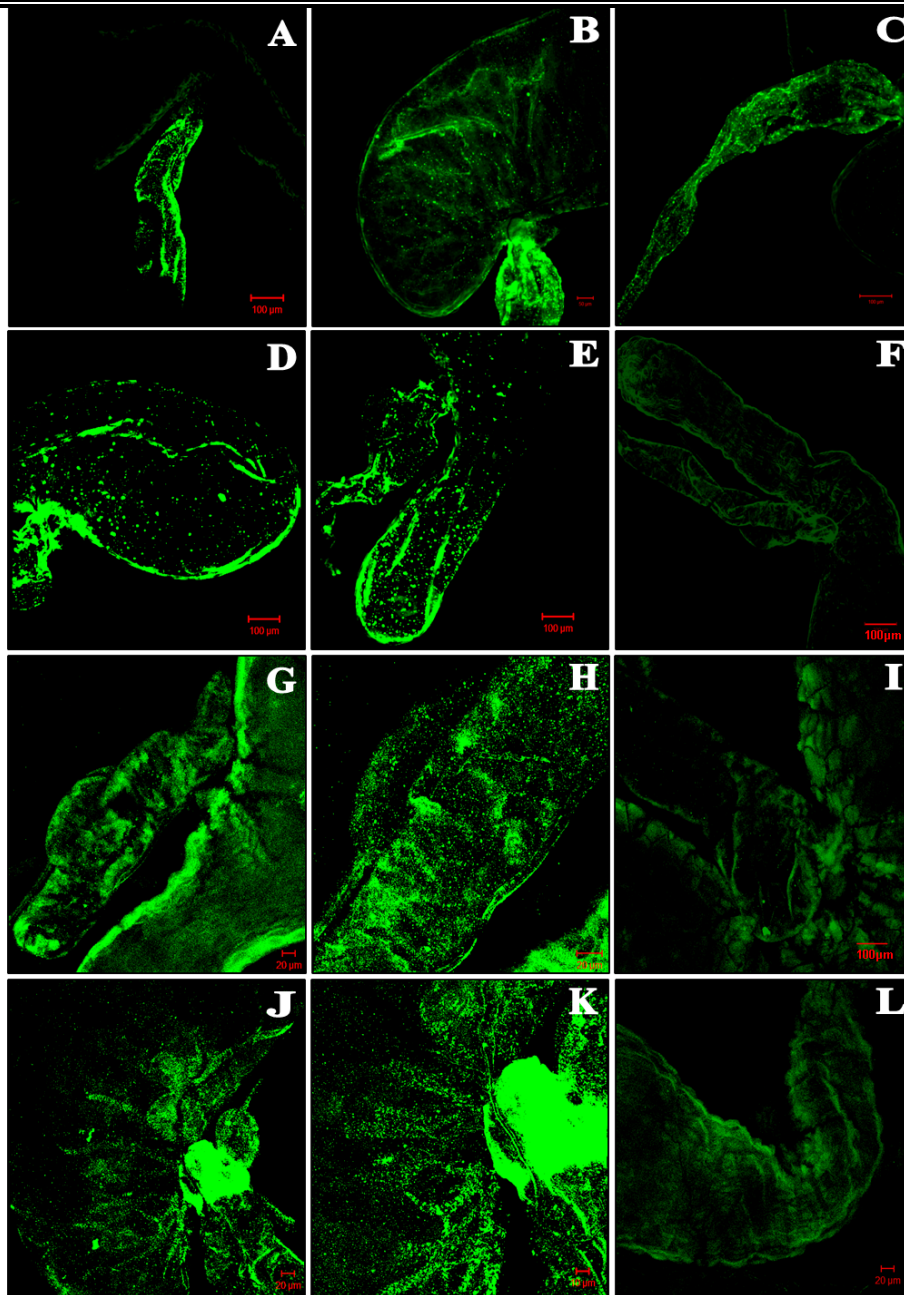


Figure 7: Salivary gland of fifth nymph *R. prolixus* labeled by antibodies against serotonin (A-F), dopamine (G-I) and tyrosine-hydroxylase (J-L). A) Unfed insects, showing serotonergic activity just along the duct; B-C) Insects with stimulated blood meal, showing serotonergic activity; D-L) Insects during feeding. Serotonergic activity is surrounded by a meshwork of serotonergic branched fibers (D-E); dopaminergic activity is visualized in the ducts (G-H); activity of tyrosine-hydroxylase is found in the muscle layers in the middle of the gland and accessory lobule. F, I, L) control group – salivary gland of insect during feeding just incubated with the secondary antibody. Notice the lack of specific labeling. Bars: A, C-F, I: 100µm; B: 50µm; G-H, J-L: 20µm.

4. Discussion

The results permitted the characterization of salivary gland during the cycle. It is very similar, which reflects the haematophagous habit in all stages. It is formed by a pair of lobes, each one composed by two lobules (principal and accessory) and two ducts (main and accessory). Each lobe is found parallel to the esophagus.

Secretion stored in both lumens can mixture in the hilum. According to Baptist (1941), each main duct leaves the hilum and passes forward into the head, where they form a very short common duct which immediately passes into the characteristic salivary pump and opens into its distal end. The accessory duct originates from the bases of the principal duct and is connected to the digestive tract at the thoracic region (Meirelles et al., 2003). Thus, the authors suggest that some salivary secretion can be expelled directly into the esophagus, in order to facilitate ingestion and/or digestion of the bloodmeal.

Some authors consider each lobe or lobule as a gland (Baptist, 1941; Barth, 1954; Lacombe, 1999; Reis et al., 2003; Meirelles et al., 2003). However, as the pair of main duct joins in a unique duct in the head, we consider each unit as a lobule, the pair of lobules a lobe and the two lobes as a gland.

During the cycle, salivary gland grows four times. However, the gland maintains the same number of cells (about 470 cells in the principal lobule). The cell grows without division and this happened because cell volume increase forty five times during the cycle. In the Malpighian tubules of *R. prolixus*, the bi-nucleated cell grows without division during the cycle. The authors observed that, at each larval moulting, the DNA content of the nuclei doubles. At the final moulting to the adult, however, the DNA content does not change, even though the tubules grow considerably thereafter (Maddrell et al., 1985). The authors suggest that DNA replication is achieved by endomitosis and this is a well adapted mechanism to providing, without interruption, the excretory needs of the growing insect. So, it can be suggested that the same happens with salivary glands: the growth without division provides the secretion necessary to the bloodmeal and insect growth.

Salivary glands of other arthropods also grow without division. In *Bombyx mori*, the two independent salivary glands made up by 330 cells and grow about 1000 fold during larval development (Parthasarathy and Gopinathan, 2005). In ixodid females, the mass and protein content of the salivary glands increase about 25-fold during feeding, but the number of cells does not increase (Sauer et al., 1995).

The techniques show some characteristics of muscle and nerve cells and trachea. During feeding, muscles are responsible for gland contraction and saliva releasing. According to Orchard and Brugge (2002), salivary gland is under control neural and neurohormonal.

Muscle covering is observed in glands of other arthropods, as triatomines (*T. infestans*, *R. domesticus*), bed bugs (*Cimex hemipterus*), spittle bugs (*Mahanarva fimbriolata*) and armad spider (*Phoneutria nigriventer*) (Nunes and Camargo-Mathias, 2006; Serrão et al., 2008; Silva et al., 2008). Duct is also covered by muscle cells and trachea. Thus, it is

suggested that duct contractions help to move saliva along it, as already proposed by Meirelles and collaborators (2003). In addition, the large amount of trachea provides the intense oxygenation of the organ, necessary to the intense metabolism of the gland and muscle activity during secretion.

Histological analysis showed the structural organization of the cells and some differences between the two lobules. Toluidine Blue showed bigger nucleus and nucleolar area in the principal lobule, which suggests a higher metabolism of it. In addition, PAS and Bromophenol Blue revealed a higher staining of this lobule, revealing a higher concentration of polysaccharide and total protein in it. Anhê and collaborators (2007) studied the acid phosphatase activity in salivary gland of *R. prolixus* e *R. neglectus*. The authors found a less intense reaction in the accessory lobule, suggesting a small metabolism of the unit.

DAPI labeling and Toluidine Blue showed bulky and polyploidy nuclei in the principal lobule. Polyploidy is a common phenomenon in many tissue insects, as midgut, epidermis, fat body, Malpighian tubules, trachea and ovary follicle (Edgar and Orr-Weaver, 2001). Besides this polyploidy, principal lobule has bi-nucleated cells in all stages. This increasing in mass nuclear possible an intense metabolism, necessary to accelerate and regulate cellular regeneration after secretion (Barth, 1954). However, while some authors indicated bi-nucleated cells (Baptist, 1941; Anhê et al., 2007; Anhê and Azeredo-Oliveira, 2008; Nussenzveig et al., 1995), others suggested mononucleated cells during division (Meirelles et al., 2003). Bi-nucleated cells are also visualized in salivary gland cells of the bed bug *C. hemipterus* (Serrão et al., 2008).

Toluidine Blue also shows an intense cytoplasmatic metacromasy, characteristic of the presence of cytoplasmatic RNA, and a big nucleolar area. Ultrastructural analysis showed that cells are rich in endoplasmatic reticulum and mitochondria (Meirelles et al., 2003). These characteristics indicate the high metabolism of the cells, necessary to the production and secretion of saliva.

Apical region of principal lobule is formed by membrane infoldings, increasing the membrane area available to secretion. This suggests that some secretion from the cell to the lumen occurs by diffusion across these infoldings (Reis et al., 2003; Meirelles et al., 2003). Some authors suggested that this mechanism is used for nitric oxide secretion (Nussenzveig et al., 1995) Membrane infoldings are also observed in the principal duct. In cockroach (*Periplaneta americana*), they are involved in electrolyte and water transport (Kessel and Beams, 1963; Sutherland and Chillseyzn, 1968).

Many vesicles are observed during secretion to the lumen. In detail, the ultrastructure shows some small vesicles inside the big ones. Vesicles are characteristic of the apocrine type of secretion. In addition, the histological analysis shows some entire cells in the lumen, suggesting the holocrine as other type of secretion. Some cells show condensed chromatin, characteristics of apoptotic cells.

In other Hemiptera, the studies suggested apocrine and merocrine in salivary gland of *T. infestans* (Reis et al., 2003) and *C. hemipterus* (Serrão et al., 2008), or just merocrine *R. domesticus* (Meirelles et al., 2003).

In addition, two nerves are visualized in the gland. According to Orchard (2006), serotonin-like efferent neurons in the sub-oesophageal ganglion pass anteriorly towards the mouthparts, join the salivary nerve and result in fine processes covering the paired salivary glands. Serotonin is also delivered to the salivary glands via the frontal ganglion and recurrent nerve projecting from the oesophagus.

Imunolabeling against nerve cells (serotonin, dopamine and tyrosine-hydroxylase) shows difference in intensity and place labeling. The results reveal that, among the neurotransmitters used, serotonin is the most abundant, since it is observed in the entire gland.

Serotonergic activity is found in insects with stimulated blood meal. Serotonin is released before the bite, despite salivation occurs just after it (in the probing and engorgement phases) (Soares et al., 2006). Thus, this suggests that serotonin prepares gland to the bite, contracting it. These contractions could contribute to the mixing of salivary gland contents, as well as potentially squeezing the saliva out of the principal gland (Orchard and Brugge, 2002).

During blood meal, the serotonergic activity increases in the whole gland. According to Orchard and Brugge (2002), the amplitude of contractions induced by neural stimulation is dependent upon both intensity and frequency of nerve stimulation. Serotonin increase AMP cyclic and the frequency and amplitude of contractions as a dose-dependent manner (Orchard, 2006). So, this increasing in serotonergic activity would permit gland contraction and saliva releasing.

Ducts showed serotonergic activity in all groups analyzed. Activity of dopamine and tyrosine-hydroxylase are observed just in insects during feeding. Activity of dopamine and tyrosine-hydroxylase was observed in *Periplaneta americana* (Lang and Walz, 1999) and *Carausius morosus* (Ali and Orchard, 1996). In *P. americana*, dopamine stimulates the salivary duct cells, suggesting that it controls their most probable function, the modification

of primary saliva. Serotonergic activity was already demonstrated in salivary ducts of *R. prolixus* (Orchard, 2006).

Em *P. americana*, dopamine stimulates the production of a completely proteinfree, watery saliva, whereas serotonin is necessary to stimulate secretion of the proteinaceous saliva components (Just and Walz, 1996). Thus, dopamine is not merely more effective in stimulating salivation than serotonin: dopamine and serotonin stimulate different cell types.

During feeding, salivary gland of *R. prolixus* also shows activity of tyrosine-hydroxylase in the muscle layers in the middle of the gland and in the accessory lobule. Tyrosine is indicative of the presence of catecholamines (dopamine, noradrenaline, adrenaline). According to Evans (1980), dopamine is the major amine found in insects (Evans, 1980). However, no dopaminergic activity is observed in the muscle layers in the middle of the gland and in the accessory lobule, suggesting the presence of other catecholamine in the tyrosine-hydroxylase-positive neurons.

So, the results showed that dopamine, serotonin and tyrosine-hydroxylase are important during feeding. Thus, quantity studies are necessary, to elucidate threshold, possible releasing of different secretions and functions in the ducts.

5. Acknowledgments

The authors thank Liléia Diotaiuti, director of the insectary of the Laboratory of Triatomines and Epidemiology of the Chagas Disease for providing the insects. The financial support of FIOCRUZ (scholarship) is gratefully acknowledged.

6. References

Ali, D.W. and Orchard, I. (1996). Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in the ventral nerve cord of the stick insect, *Carausius morosus*, including neurons innervating the salivary glands. *Cell Tissue Res.* **285**, 453–462.

Anhê, A.C.B. and Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2008). Cytochemical characterization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* salivary gland cells (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron* **39**, 1126-1133.

Anhê, A.C.B., Lima-Oliveira, A.P.M. and Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2007). Acid phosphatase activity distribution in salivary glands of triatomines (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Genet. Mol. Res.* **6** (1), 197–205.

Baptist, B.A. (1941). The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Quart Jour of Micr Sci* **82**, 91-139.

Barth, R. (1954). Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). IV. Parte: O complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **52**, 517-585.

Coura, J.R. and Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* **115** (1-2), 5-13.

Edgar, B.A. and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297–306.

Evans, P.D. (1980). Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv Insect Physiol* **15**, 317–473.

Hecker, H., Schwarzenbach, M. and Rudin, W. (1990). Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug, *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res* **76**, 311-318.

Just, F. and Walz, B. (1996). The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *J Exp Biol* **199**, 407–413.

Kessel, R.G. and Beams, H.W. (1963). Electron microscope observations on the salivary gland of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Z Zellforsch* **59**, 857.877

Lacombe, D. (1999). Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94** (4), 557-564.

Lang, I. and Walz, B. (1999). Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* **202**, 729–738.

Maddrell, S.H.P., Lane, N.J., Harrison, J.B. and Gardiner, B.O.C. (1985). DNA replication in binucleate cells of the Malpighian tubules of Hemipteran insects. *Chromosoma* **91** (3-4), 201-209.

Meirelles, R.M., Rodrigues, I.S., Steindel, M. and Soares, M.J. (2003). Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *J Submicrosc Cytol Pathol* **35** (2), 199-207.

Nunes, P.H. and Camargo-Mathias, M.I. (2006). Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae). *Micron* **37**, 57–66.

Nussenzveig, R.H., Bentley, D.L. and Ribeiro, J.M. (1995). Nitric oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol* **198**, 1093–1098.

Orchard, I. (2006). Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol.* **144**, 316–324.

Orchard, I. and Brugge, V.A.T. (2002). Contractions associated with the salivary gland of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*: evidence for both a neural and neurohormonal coordination. *Peptides* **23**, 693–700.

Parthasarathy, R. and Gopinathan, K.P. (2005). Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expr Patterns* **5**, 323–339.

Reis, M.M., Meirelles, R.M.S. and Soares, M.J. (2003). Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue Cell* **35**, 393-400.

Rocha, F.F., Araujo, R.N., Silva, L.M., Gontijo, N.F. and Pereira, M.H. (2010). Primary culture of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**(2), 132-136.

Sauer, J.R., Mcswain, J.L., Bowman, A.S. and Essenberg, R.C. (1995). Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol* **40**, 245–267.

Serrão, J.E., Castrillon, M.I., Santos-Mallet, J.R., Zanuncio, J.C. and Gonçalves, T.C.M. (2008). Ultrastructure of the Salivary Glands in *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J Exp Biol* **45**(6), 991-999.

Secundino, N.F., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santero, M.M. and Pimenta, P.F.P. (2005). *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *J. Med. Entomol.* **42**, 928–938

Silva, L.M., Botelho, A.C.C., Nacif-Pimenta, R., Martins, G.F., Alves, L.C., Brayner, F.A., Fortes-Dias, C.L. and Pimenta, P.F.P. (2008). Structural analysis of the venom glands of the armed spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891): Microanatomy, fine structure and confocal observations. *Toxicon* **51**, 693–706.

Soares, A.C., Carvalho-Tavares, J., Gontijo, N.F., Dos Santos, V.C., Teixeira, M.M. and Pereira, M.H. (2006). Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol* **52**, 468–472.

Sutherland, D.J. and Chillseyzn, J.M. (1968). Function and operation of cockroach salivary reservoir. *J Insect Physiol* **14**, 21-31.

8.2 Anexo 2 – Anhô & Azeredo-Oliveira, 2008

Na tese são apresentadas as glândulas salivares de insetos durante o desenvolvimento pós-embrionário e de adulto macho. Este artigo, oriundo do mestrado e que originou a tese, apresenta as glândulas salivares de adultos machos e fêmeas, complementando as informações apresentadas pela tese.

Anhô ACB, Azeredo-Oliveira MTV. Cytochemical characterization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* salivary gland cells (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron*. 2008; 39: 1126-1133.

Cytochemical Characterization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* Salivary Gland Cells (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).

A. C. B. Anhô, M. T. V. Azeredo-Oliveira *.

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

tercilia@ibilce.unesp.br

Running Title: Cytochemical Characterization of Triatomine Salivary Glands.

Abstract

The Triatominae subfamily has medical sanitary importance, since these insects are vectors of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas Disease, and *Trypanosoma rangeli*, which develops in the salivary glands and it is frequently found in mixed infections with *T. cruzi*. Triatomines of *Triatoma* and *Panstrongylus* genera possess a salivary gland complex composed of a pair with three well differentiated units: the anterior (D1), median (D2) and posterior (D3). Saliva is secreted during blood meal and antagonizes hemostatic, inflammatory and immunological systems imposed by the host, which facilitate the hematophagy. In order to identify nuclear structures, we studied interphase nuclei of salivary

gland cells of adult insects, males and females, of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*. The glands were removed from insects, fixed in acetic acid (45%) and lactic acid (50%), squashed and submitted to different cytochemical methods: lacto-acetic orcein, silver ion impregnation, Feulgen reaction, Toluidine blue, Variant method of Critical Electrolyte Concentration and C-banding. The preparations were examined with a Zeiss Jenaval photomicroscope and photographed. The results evidenced predominance of binucleated cells in D1 and D2 glands and mononucleated ones in D3. In all salivary glands were observed bulky and polyploid nucleus, a clear association between nucleolar and heterochromatic corpuscles, cytoplasmatic metachromasy and many pre-secretion vesicles in cytoplasm. Such characteristics were associated with intense synthesis activity to produce the saliva. Species were mainly differentiated by a larger heterochromatic corpuscle observed only in *T. infestans* (called as chromocenter), while *P. megistus* showed a predominance of euchromatin, with some heterochromatic corpuscles just in males. Females of both species showed a smaller quantity of heterochromatin, which could be related to the high metabolism because of the oviposition.

Keywords: Chromatin, nucleolar corpuscles, polyploidy nuclei, salivary glands, Triatominae, Hemiptera.

Introduction

Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) are hematophagous insects of medical importance as they act as invertebrate hosts of *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas Disease. This infirmity occurs in Latin America and infects about 9 – 12 million people (Souza, 2007). Triatomines, especially *Rhodnius* genus, are also hosts of *Trypanosoma rangeli*, which is apparently harmless to humans but can be pathogenic to the insect vector (Hecker *et al.*, 1990). Both species share common antigens and cross react serologically, which hinders differential diagnosis of parasitemias (Cuba Cuba, 1998).

Triatomines of *Triatoma* and *Panstrongylus* genera have a salivary complex formed by a pair of glands, each pair containing three independent units: D1 (anterior or main), D2 (median or supplementary) and D3 (posterior or accessory) (Barth, 1954). The first is elongated and whitish, the second is rounded and yellowish and the third is rounded and translucent (Reis *et al.*, 2003).

Salivary gland cells have two nuclei with accentuated polyploidy (Barth, 1954). Recently, acid phosphatase technique showed enzyme activity in the heterochromatin and nucleolus, which showed the most intense response (Anhê *et al.*, 2007). Ultrastructural analysis showed abundant endoplasmic reticulum, mitochondria and microvilli in the apical plasma membrane domain, thus enlarging the membrane area available for saliva secretion (Reis *et al.*, 2003; Meirelles *et al.*, 2003). However, cytochemical characteristics of these polyploid cells are less known.

Saliva of these hematophagous insects abounds in substances that facilitate feeding, like anticoagulants (Hellman and Hawkins, 1964; 1965; Pereira *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1998), antihistamines (Ribeiro and Walker, 1994), vasodilators (Ribeiro *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1993; Ribeiro and Nussenzveig, 1993) and inhibitors of platelet aggregation (Ribeiro and Garcia, 1980; 1981; Sarkis *et al.*, 1986; Ribeiro and Sarkis, 1982; Francischetti *et al.*, 2000). Saliva is secreted during blood meal and antagonizes hemostatic, inflammatory and immunological systems imposed by the host (Ribeiro and Francischetti, 2003). Recently, the sialotranscriptome of *Triatoma brasiliensis* showed a high number and variety of lipocalins, a great number of serine proteases and a vasodilator with high homology to the Kazal protein (Santos *et al.*, 2007).

This saliva, in association with cryptic behavior, nocturnal habits of triatomines and mechanical adaptations of mouthparts, allows few perceivable bites thus enabling high efficiency during blood meal.

Considering the lack of cytochemical studies in this area, our purpose was to identify nuclear (chromatin and nucleolus) structures in triatomine salivary gland cells. Besides, we also described aspects that allowed us to compare and differentiate sexes and species used.

Materials and Methods

Salivary glands of adult, male and female, triatomines of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* species were used. Sixty insects of each specie (thirty of each sex) were provided by the Insectary of the Araraquara Special Health Service, organ of the São Paulo University (Araraquara - SP, Brazil).

Triatomines were dissected in Demerec solution, salivary glands were removed and fixed in acetic acid (45%) and lactic acid (50%), squashed and submitted to different cytochemical methods: lacto-acetic orcein (De Vaio *et al.*, 1985, with modifications), silver

ion impregnation (Howell and Black, 1980, with modifications), Feulgen reaction (Mello and Vidal, 1980, with modifications), Toluidine Blue, Variant method of Critical Electrolyte Concentration (CEC) (Mello *et al.*, 1993, with modifications) and C-banding (Sumner, 1972, with modifications). The preparations were examined with a Zeiss Jenaval photomicroscope and photographed, after which the negatives were developed and printed in specialized laboratories.

Results

Cytochemical techniques showed salivary gland cells of males and females of *T. infestans* (Fig. 1 and 2) and *P. megistus* (Fig. 3 and 4). Bulky and polyploid nuclei were observed with a predominance of binucleated cells in D1 and D2 and mononucleated ones in D3.

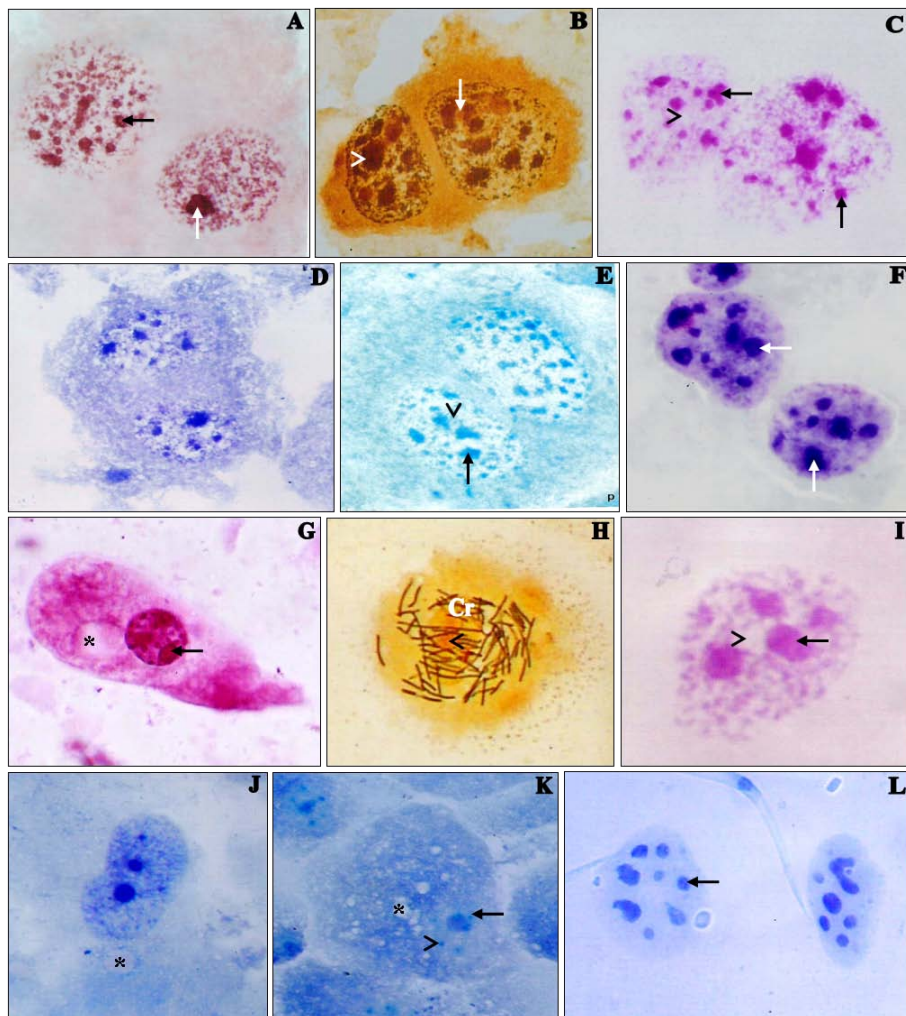


Figure 1: Polyloid nuclei of anterior (D1), median (D2) and posterior (D3) salivary glands of males of *Triatoma infestans*, stained by the following cytochemical methods: **Lacto-acetic Orcein** (A, G), **Silver ion impregnation** (B, H), **Feulgen reaction** (C, I), **Toluidine blue** (D, J), **Variant method of**

Critical Electrolyte Concentration (E, K) e C-banding (F, L).

A - F: Binucleated cells of D1 and D2.

G - L: Mononucleated cells of D3.

Notice the presence of pre-secretion vesicles (*) and thin crystals (Cr) in cytoplasm. Arrows indicate heterochromatic corpuscles and arrowhead the nucleolar ones.

Magnifications: A - H, J - L = 1344x; I = 1554x.

In salivary glands of both sexes of *T. infestans*, the techniques of orcein (Fig. 1-2 A, G), Feulgen reaction (Fig. 1-2 C, I), Variant of CEC (Fig. 1-2 E, K) and C-banding (Fig. 1-2 F, L) showed many heterochromatic corpuscles of different sizes, mainly round. In general, they were larger but fewer in D3 (Fig. 1-2 G, I, K, L). Light halos were also observed in association with heterochromatin (characteristic of nucleolar corpuscles) and a thin granulation dispersed in the nuclei. Mainly in D1 and D2 males, orcein showed, only in one nucleus, a larger heterochromatic corpuscle (Fig. 1A).

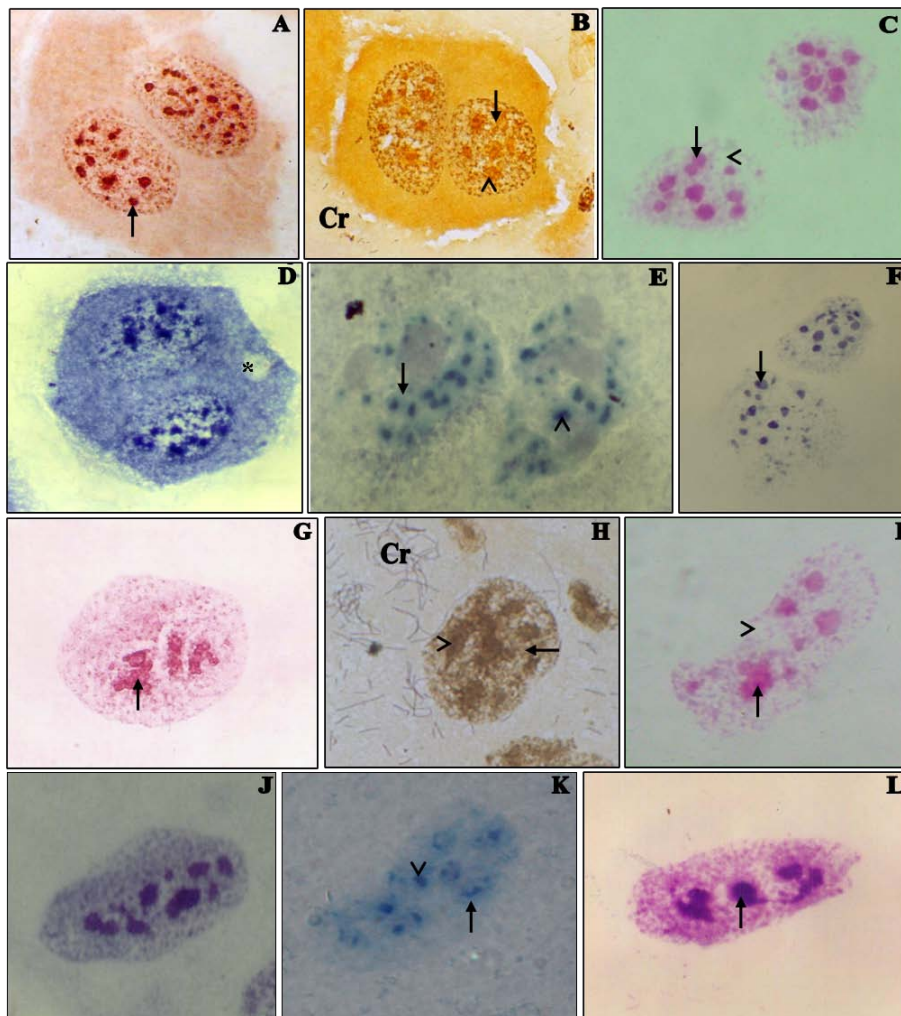


Figure 2: Polyploid nuclei of anterior (D1), median (D2) and posterior (D3) salivary glands of females of *Triatoma infestans*, stained by the following cytochemical methods: **Lacto-acetic Orcein (A, G), Silver ion impregnation (B, H), Feulgen reaction (C, I), Toluidine blue (D, J), Variant method of Critical Electrolyte Concentration (E, K) e C-banding (F, L).**

A - F: Binucleated cells of D1 and D2.

G - L: Mononucleated cells of D3.

Notice the presence of pre-secretion vesicles (*) and thin crystals (Cr) in cytoplasm. Arrows

indicate heterochromatic corpuscles and arrowhead the nucleolar ones.

Magnifications: A - D, F - H = 1344x; E, I - L = 1554x.

In the three units, silver ion impregnation (Fig. 1-2 B, H) and Variant of CEC (Fig. 1-2 E, K) showed large circular nucleolar corpuscles, in association with heterochromatic regions. A high number of thin and impregnated crystals were observed in cytoplasm of D3 cells and, sometimes, accumulated on the cell surface, overlapping the nuclei (Fig. 1H; 2B, H).

In male *P. megistus*, nuclei showed highly stained chromatin with granular aspect (Fig. 3A, C-G, I-L) and, mainly under orcein (Fig. 3G), Variant of CEC (Fig. 3E) and C-banding (Fig. 3F, L), one or two heterochromatic corpuscles were detached. In D1 and D2, nucleolar corpuscles were smaller and dispersed from the nuclei (Fig. 3B) or large and singular (like the blue mass in Toluidine Blue and Variant of CEC [Fig. 3D, E] and light halo observed by orcein, Feulgen reaction and C-banding [Fig. 3A, C, F, respectively]). In D3, a single, enlarged round nucleolar corpuscle was found (Fig. 3H, J, K).

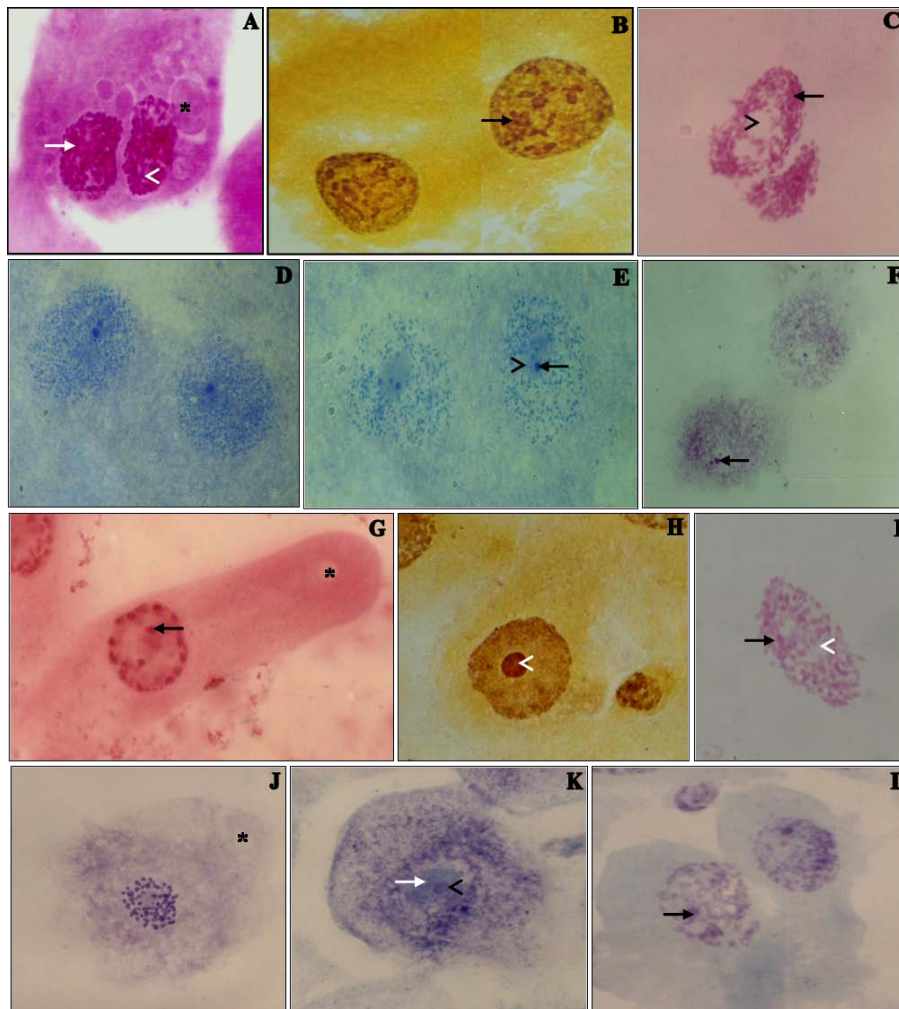


Figure 3: Polyyploid nuclei of anterior (D1), median (D2) and posterior (D3) salivary glands of males of *Panstrongylus megistus*, stained by the following cytochemical methods: **Lacto-acetic Orcein** (A, G), **Silver ion impregnation** (B, H), **Feulgen reaction** (C, I), **Toluidine blue** (D, J), **Variant method of Critical Electrolyte Concentration** (E, K) e **C-banding** (F, L).

A - F: Binucleated cells of D1 and D2.

G – L: Mononucleated cells of D3

Notice the presence of pre-secretion vesicles (*) and thin crystals (Cr) in cytoplasm. Arrows indicate heterochromatic corpuscles and arrowhead the nucleolar ones.

Magnification: A - C, G - L = 1344x; D - F = 1554x.

In salivary gland cells of female *P. megistus* (Fig. 4), chromatin was highly stained and dispersed homogeneously from the nuclei, without the formation of corpuscles (Fig. 4A, C-G, I-L). Silver ion impregnation and Variant of CEC characterized the presence of just one large round nucleolar corpuscle (Fig. 4B, E, H, K).

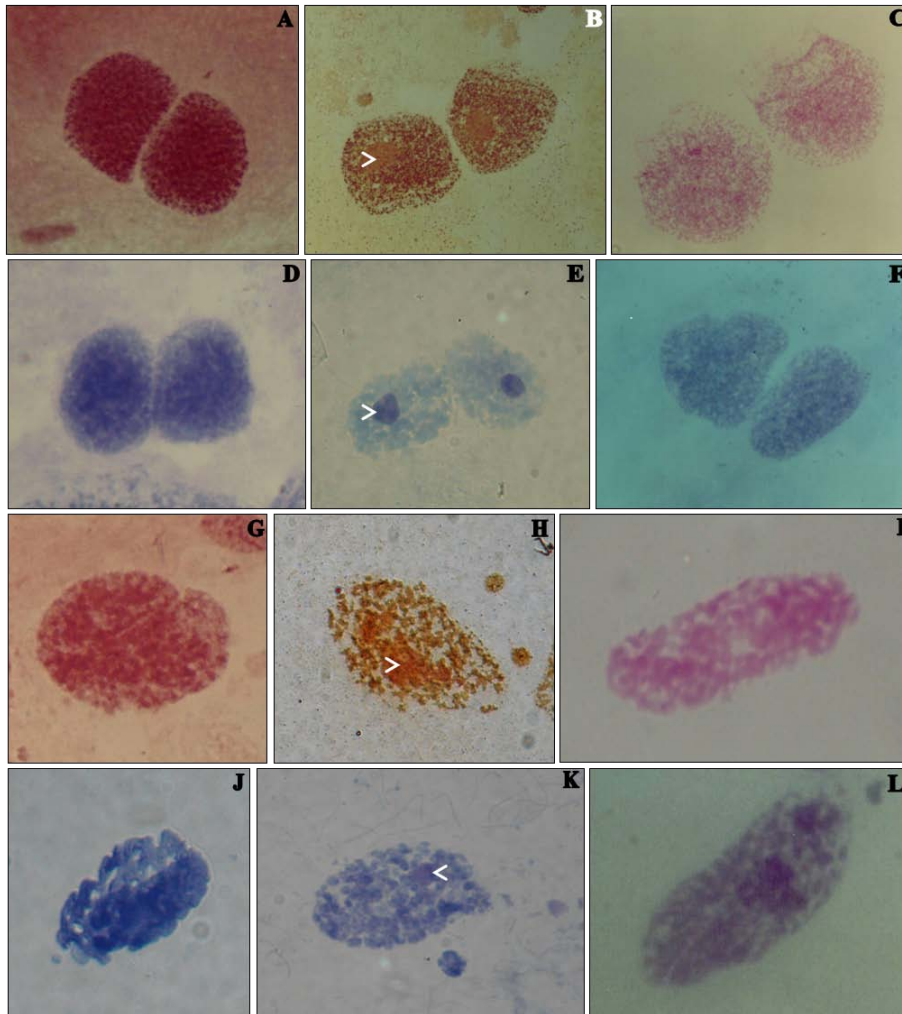


Figure 4: Polyloid nuclei of anterior (D1), median (D2) and posterior (D3) salivary glands of females of *Panstrongylus megistus*, stained by the following cytochemical methods: **Lacto-acetic Orcein** (A, G), **Silver ion impregnation** (B, H), **Feulgen reaction** (C, I), **Toluidine blue** (D, J), **Variant method of Critical Electrolyte Concentration** (E, K) e **C-banding** (F, L).

A - F: Binucleated cells of D1 and D2.

G – L: Mononucleated cells of D3.

Arrows indicate nucleolar corpuscles. Observe the absence of heterochromatic corpuscles and the presence of euchromatin dispersed from the nuclei.

Magnifications: A - H, J - K = 1344x; I, L = 1554x.

In general, Variant of CEC showed, in all salivary gland cells of the two species analyzed, blue nucleolar corpuscles surrounded by green chromatinic halos, of different sizes and numbers (Fig. 1-4 E, K). For the control technique, a Toluidine Blue without magnesium

chloride (MgCl_2) was used and cells were shown to be metachromatic in all nuclear (euchromatin, heterochromatin and nucleolar corpuscles) and cytoplasmatic components (violet tones) (Fig. 1-4 D, J), except some light secretion vesicles in cytoplasm (Fig. 1J; 2D; 3J).

Cytoplasm was mainly stained by silver ion impregnation (Fig. 1-4 B, H), Toluidine Blue (Fig. 1-4 D, J) and Variant of CEC (Fig. 1-4 E, K). Light and rounded cytoplasmatic vesicles were observed in *T. infestans* (Fig. 1G, J, K; 2D) and in *P. megistus* (Fig. 3A, G, J).

Discussion

The cytochemical methods (lacto-acetic orcein, silver ion impregnation, Feulgen reaction, Toluidine blue, Variant method of Critical Electrolyte Concentration and C-banding) evidenced morphological and structural aspects of the nucleus (euchromatin, heterochromatin and nucleolus) of salivary gland cells of *T. infestans* and *P. megistus* (males and females).

The salivary glands of males and females were morphologically similar, since both possess a pair of glands, each pair containing three independent units (D1, D2 and D3). In triatomines of *Rhodnius* genus, males and females possess a pair of glands with just two units, called accessory and principal (Meirelles *et al.*, 2003). It is interesting to note that, in mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens* and *Anopheles darlingi*, glands are morphologically distinct between the sexes (Orr *et al.*, 1961; Wright, 1969; Janzen and Wright, 1971; Barrow *et al.*, 1975; Moreira-Ferro *et al.*, 1999; Dhar and Kumar, 2003), since hematophagy occurs just in females. In triatomines, the same hematophagous habits result in glands morphologically similar between the sexes, as it was observed in the two species analyzed.

Salivary gland cells showed bulky and polyploid nuclei, a common phenomenon in many insect tissues, like gut, epidermis, fat body, Malpighian tubules, trachea, ovarian follicle and nurse cells (Edgar and Orr-Weaver, 2001). Furthermore this polyploidy, D1 and D2 showed binucleated cells and all this increase of nuclear mass may provide an intense metabolism, essential to speed up and regulate cellular regeneration after secretion (Barth, 1954).

Three techniques were used for chromatin staining: lacto-acetic orcein, for proteins-DNA complexed (acidophilic reaction); Feulgen reaction, for DNA, and C-banding, for constitutive heterochromatin. These techniques showed enlarged heterochromatic corpuscles in *T. infestans* and, mainly in males, a larger heterochromatic body. According to some

authors (Solari, 1979; Panzera *et al.*, 1992; Perez *et al.*, 1997), the three largest autosomes and the sex chromosome can be packed into a heterochromatic body called the chromocenter (Mello, 1971, 1975). Thus, our data confirm the literature and we suggest that the heterochromatic body observed in male *T. infestans* corresponds to the chromocenter, as observed in Malpighian (Mello and Recco-Pimentel, 1987) and seminiferous tubule cells of this specie (Azeredo-Oliveira, 1990).

P. megistus presented predominance of euchromatin and, only in males, heterochromatic corpuscles were observed. Tartarotti and Azeredo-Oliveira (1999) suggested that, in this specie, heterochromatin was characteristic of Y chromosome, but could also be present in X₁ and X₂ chromosomes. Thus, the one or two heterochromatic corpuscles observed probably correspond to the Y or XY condensed chromosomes.

Panzera *et al.* (2004) analyzed the main karyologic changes that have occurred during the dispersal of *T. infestans*. They identified that, during the domesticating of the insect, a reduction of heterochromatin and DNA amounts occurred. Then, they proposed that heterochromatin and DNA variation mainly reflected adaptive genomic changes that contributed to the ability of *T. infestans* to survive, reproduce, and disperse in different environments. Considering this, we can suggest that the distinct heterochromatization pattern presented by *T. infestans* and *P. megistus* may constitute part of the interspecific differences accumulated during the evolutionary process.

Azeredo-Oliveira (1990) studied Malpighian tubule cells of *T. vitticeps* and observed an accentuated reduction of heterochromatic area in females. Considering the hypothesis of heterochromatin gene inactivity to be correct, the author suggested that reduction was associated with the higher metabolism due to oviposition. In general, salivary gland cells of females presented a smaller quantity of heterochromatin which, as proposed by Azeredo-Oliveira (1990), can be related to high metabolism. Because of oviposition, females need to ingest large quantities of blood and, thus, need augmented salivary secretion during hematophagy.

For RNA staining, the impregnation by silver ions was used. This technique stains proteins present in nucleolar bodies, as nucleolin (C23) and numatrin (B23), both localized in the nucleolus during interphase (Ochs *et al.*, 1983). It was evidenced a large nucleolar area in both analyzed species, as observed in triatomines of *Rhodnius* genera (Anhê *et al.*, 2007). Studies suggest that nucleolar area is related to the cell metabolism, since fully active nucleoli are large, with extensive intermingling of fibrillar centers, dense fibrillar component and granular component (Nanya and Bicudo, 1995; Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Thus, as

nucleolus size and number are directly proportional to the cell's functional state, we can suggest that the large nucleolar area observed is related to the high metabolism of salivary glands, necessary for production of saliva. These data confirm the studies of Barth (1954), in which he described three to five nucleoli per cell that were included in numerous chromatic structure.

Cytochemically, DNA and RNA were distinguished by Variant method of Critical Electrolyte Concentration (CEC). In this method, the material is first submitted to the Toluidine blue, when DNA and RNA stains bluish (control technique). Following, the slides were treated with Mg^{2+} 0,05M until metachromasy abolishment of DNA. Under these conditions, DNA stains green and RNA remains stained metachromatically (blue), allowing special discrimination of them (Mello, 1997).

In the present study, blue nucleolar corpuscles were surrounded by green chromatinic halos, which confirms association between DNA and RNA, proposed by other techniques utilized. This very close association, classically observed in other tissues and organisms, evidences the functional relationship between these structures, very important to the maintenance of nucleolar architecture (Azeredo-Oliveira, 1990; Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Staining with just Toluidine Blue was employed as control for the technique, when DNA and RNA showed the same metachromatic blue coloration.

The amount of protein which stains by silver ion impregnation may indicate the state of cell activity as a function of ribosomic synthesis (Mello, 1997). It is conceivable that the silver-positive impregnation in cytoplasm reflects the presence of cytoplasmatic RNAs (mRNA, tRNA, rRNA), which indicates the high metabolism of gland cells. This metabolism is reflected in high protein synthesis, necessary for the composition of saliva. This could be also evidenced by the metachromatic blue evidenced by variant of CEC.

Silver ion impregnation showed, in *T. infestans* gland cells, thin and highly impregnated crystals. Barth (1954) suggested these crystals represent the raw material that would liquefy at the beginning of the secretion, during the bite. These crystals were also evidenced by the method of Gömori (1950) to detected acid phosphatase (data not published).

Besides, different forms and sizes of nuclei were observed, which could be related to the saliva secretion. According to Barth (1954), there are four to six phases to the saliva secretion, when occur the pre-secretion and secretion synthesis, the transport of substances, the secretion of the saliva and the cell regeneration. Barth (1954) and Lacombe (1999) also observed that the insect nutrition changes the cell morphology. To avoid this variable, in this study the insects were dissected some days after feeding.

Some techniques showed rounded and light vesicles in cytoplasm of both species. These probably represent the pre-secretion, which would be eliminated by the cell and stored in the lumen like a secretion product (Barth, 1954). Recently, Reis *et al.* (2003) suggested a passive translocation of the saliva components towards the gland lumen, which characterize a merocrine secretion. Occasionally, some apocrine secretion was observed, secreting large volumes of cytoplasmic components. Furthermore, cells presented elongated appearance when they accumulated many vesicles in cytoplasm. According to Lacombe (1999), this accumulation forces vertical growth of the cells, because neighboring cells prevent the horizontal type.

Thus, these results clearly suggest that polyploidy binucleated cells (except in D3) with bulky nuclei, large nucleoli, pre-secretion vesicles and the high metachromasy in cytoplasm are related to the intense activity of salivary gland cells. This active metabolism is reflected in high protein synthesis, necessary to the composition of saliva and may contribute to the hematophagy in triatomines.

In conclusion, chromatin staining techniques enabled to differentiate not only species but also sexes. A larger heterochromatin corpuscle was observed in *T. infestans*, while *P. megistus* exhibited a predominance of euchromatin. This structure was more evident in females, probably due high metabolism and oviposition.

Acknowledgements

The authors thank Dr. José M. Soares Barata, João Luís Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho, director and technicians, respectively, of the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA) - São Paulo Public Health School (Araraquara, SP), for providing the specimens studied. The financial support of CNPq is gratefully acknowledged.

References

Anhê, A.C.B., Lima-Oliveira, A.P.M., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2007. Acid phosphatase activity distribution in salivary glands of triatomines (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Genetics and Molecular Research* 6 (1), 197--205.

- Azeredo-Oliveira, M.T.V., 1990. Cytogenetic study in the Malpighian tubules, salivary glands and testes of triatomines (Triatominae, Heteroptera). Thesis Abstract. Brazilian Journal of Genetics 13, 640--642.
- Barth, R., 1954. Estudo Anatômico e Histológico sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 52, 517--585.
- Barrow, P.M., McIver, S.B., Wright, K.A., 1975. Salivary glands of female *Culex pipiens*: morphological changes associated with maturation and blood-feeding. Canadian Entomologist 107, 1153--1159.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., Campos, I., 2000. To be or not to be in nucleolus. Nature Cell Biology 2, E107--E.112.
- Cuba Cuba, C.A., 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31(2), 207--220.
- De Vaio, E.S., Crucci, B., Castagnino, A.M., Franca, M.E., Martinez, M.E., 1985. Meiotic differences between three triatominae species (Hemiptera, Reduviidae). Genética 67, 185--191.
- Dhar, R., Kumar, N., 2003. Role of mosquito salivary glands. Current Science 85 (9), 1308--1313.
- Edgar, B.A., Orr-Weaver, T.L., 2001. Endoreplication Cell Cycles: More for Less. Cell 105, 297--306.
- Francischetti, I.M., Ribeiro, J.M., Champagne, D., Andersen, J., 2000. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. The Journal of Biological Chemistry 275, 12639-12650.
- Gömori, G., 1950. An improved histochemical technique for acid phosphatase. Stain Tech 25, 81-85.
- Hecker, H., Schwarzenbach, M., Rudin, W., 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug, *Rhodnius prolixus*. Parasitology Research 76, 311--318.
- Hellmann, K., Hawkins, R.I., 1964. Anticoagulants and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* Stal. Nature 201, 1008--1009.
- Hellmann, K., Hawkins, R.I., 1965. Prolixin-S and Prolixin-G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. Nature 207, 265--267.
- Howell, W., Black, D.A., 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with

- protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014--1015.
- Janzen, H.G., Wright, K.A., 1971. The salivary glands of *Aedes aegypti* (L): an electron microscope study. *Canadian Journal of Zoology* 49, 1343--1345.
- Lacombe, D., 1999. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (4), 557--564.
- Meirelles, R.M., Rodrigues, I.S., Steindel, M., Soares, M.J., 2003. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva and Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 35 (2), 199--207.
- Mello, M.L.S., 1971. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). *Cytologia* 36 (1), 42--49.
- Mello, M.L.S., 1975. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas* 8 (2), 101--107.
- Mello, M.L.S., 1997. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Brazilian Journal of Genetics* 20, 257--264.
- Mello, M.L.S., Recco-Pimentel, S.M., 1987. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios* 52, 175--184.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1980. *Práticas de Biologia Celular*, Editora Edgard Blcher Ltda, Campinas.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., Dantas, M.M., Monteiro, A.L.P., 1993. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. *Acta Histochemica et Cytochemica* 26, 1--3, 1993.
- Moreira-Ferro, C. K., Marinotti, O., Bijovsky, A.T., 1999. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Tissue & Cell* 31 (3), 264--273.
- Nanya S., Bicudo, H.E.M.C., 1995. Variation of nucleolar área in fat tissue of *Drosophila mulleri* during development. *Cytobios* 81, 73--86.
- Ochs, R., Lischwe, M., O'Leary, P., Busch, H., 1983. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Experimental Cell Research* 146(1), 139--149.
- Orr, C.W., Hudson, A., West, A.S., 1961. The salivary glands of *Aedes aegypti*. *Canadian Journal of Zoology* 39, 265--272.
- Panzer, F., Alvarez, F., Sanchez-Rufas, J., Perez, R., Suja, J.A., Scvortzoff, E., Dujardin, J.P., Estramil, E., Salvatella, R., 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). *Genome* 35, 1068--1074.

- Panzer, F., Dujardin, J.P., Nicolini, P., Caraccio, M.N., Rose, V., Tellez, T., Bermúdez, H., Bargas, M.D., Mas-Coma, S., O'Connor, J.E., Pérez, R., 2004. Genomic Changes of Chagas Disease Vector. *South America Emerging Infectious Diseases* 10 (3), 438--446.
- Pereira, M.H., Souza, M.E.L., Vargas, A.P., Penido, C.M., Martins, M.S., Diotaiuti, L., 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Tropica* 61, 255--264.
- Perez, R., Panzer, F., Page, J., Suja, J.A., Rufas, J.S., 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 5 (1), 47--56.
- Reis, M.M., Meirelles, R.M.S., Soares, M.J., 2003. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue and Cell* 35, 393--400.
- Ribeiro, J.M.C., Francischetti, M.B., 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annual Review of Entomology* 48, 73--88.
- Ribeiro, J.M.C., Garcia, E.S., 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 26, 303--307.
- Ribeiro, J.M.C., Garcia, E.S., 1981. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 37, 384--386.
- Ribeiro, J.M.C., Hazzard, J.M.H., Nussenzveig, R.H., Champagne, D.E., Walker, F.A., 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260, 539--541.
- Ribeiro, J.M.C., Marinotti, O., Gonzáles, R., 1990. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *British Journal of Pharmacology* 101, 932--936.
- Ribeiro, J.M.C., Nussenzveig, R.H., 1993. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Letters* 330, 165--168.
- Ribeiro, J.M.C., Sarkis, J.J.F., 1982. Anti-thromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. *Journal of Insect Physiology* 28, 655--660.
- Ribeiro, J.M.C., Schneider, M., Isaias, T., Jurberg, J., Galvão, C.C., Guimarães, J.A., 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *Journal of Medical Entomology* 35, 599--610.
- Ribeiro, J.M.C., Walker, F.A., 1994. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxidecarrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Medicine* 180, 2251--2257.
- Sarkis, J.J., Guimarães, J.A., Ribeiro, J.M.C., 1986. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochemical Journal* 233, 885--891.

Santos, A., Ribeiro, J.M.C., Lehane, M.J., Gontijo, N.F., Veloso, A.B., Sant'Anna, M.R.V., Araujo, R.N., Grisard, E.C., Pereira, M.H., 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37(7), 702--712.

Solari, A.J., 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae; Hemiptera). *Chromosoma* 72, 225--240.

Souza, W., 2007. Chagas' disease: facts and reality. *Microbes and Infection* 9, 544--545.

Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75, 304--306.

Tartarotti, E., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 1999. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios* 99, 113--122.

Wright, K.A., 1969. The anatomy of salivary glands of *Anopheles stephensi* Liston. *Canadian Journal of Zoology* 47, 579--587.

9 Referências Bibliográficas

Ali DW. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *J Exp Biol.* 1997; 200: 1941–1949.

Ali DW, Orchard I. Characterization of dopamine and serotonin receptors on the salivary glands of the locust, *Locusta migratoria*. *Biog Amines.* 1994; 10: 195–212.

Ali DW, Orchard I. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in the ventral nerve cord of the stick insect, *Carausius morosus*, including neurons innervating the salivary glands. *Cell Tissue Res.* 1996a; 285: 453–462.

Ali DW, Orchard I. The uptake and release of serotonin and dopamine associated with locust (*Locusta migratoria*) salivary glands. *J Exp Biol.* 1996b; 199: 699–709.

Ali DW, Orchard I, Lange AB. The aminergic control of locust (*Locusta migratoria*) salivary glands: evidence for serotonergic and dopaminergic innervation. *J Insect Physiol.* 1993; 39: 623–632.

Amino R, Martins RM, Procópio J, Hirata I, Juliano MA, Schenkman S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem.* 2002; 277: 6207–6213.

Amino R, Porto RM, Chammas R, Egami MI, Schenkman S. Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. *J Biol Chem.* 1998; 273: 24575–24582.

Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schuck P, Ribeiro JM. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic aminebinding protein from the saliva of a blood-feeding insect. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4611–4617.

Andersen JF, Gudderra NP, Francischetti IM, Ribeiro JM. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2005; 58: 97–105.

Andersen JF, Weichsel A, Balfour CA, Champagne DE, Montfort WR. The crystal structure of nitrophorin 4 at 1.5 Å resolution: transport of nitric oxide by a lipocalin-based heme protein. *Structure*. 1998; 6 (10): 1315-1327.

Anhê ACB. Estudo Citoquímico e Ultra-estrutural em Glândulas Salivares de Triatomíneos (Heteroptera, Triatominae) [dissertação]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Anhê ACB, Azeredo-Oliveira MTV. Cytochemical characterization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* salivary gland cells (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron*. 2008; 39: 1126-1133.

Anhê ACB, Lima-Oliveira APM, Azeredo-Oliveira MTV. Acid phosphatase activity distribution in salivary glands of triatomines (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Genet. Mol. Res*. 2007; 6 (1): 197–205.

Araújo RN, Soares AC, Paim RMM, Gontijo NF, Gontijo AF, Lehane MJ, Pereira MH. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2009; 39: 83–88.

Azeredo-Oliveira MTV. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e túbulos seminíferos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera) [doutorado]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 1990.

Baines RA, Tyrer NM. The innervation of locust salivary glands. II. Physiology of excitation and modulation. *J Comp Physiol*. 1989; 165: 407–413.

Baines S. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol*. 1956; 33: 533-541.

Baptist BA. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Quart Jour of Micr Sci*. 1941; 82: 91-139.

Barth R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). IV. Parte: O complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1954; 52: 517-585.

Basso B, Moretti ERA, Vottero-Cima E. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli* – immunized mice. Am J Trop Med Hyg. 1991; 44: 413-419.

Beard CB, Durvasula RV, Richards FF. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. Emerg Infect Dis. 1998; 4: 581–591.

Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. Int J Parasitol. 2001; 31: 621-627.

Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of chagas disease transmission. Annu. Rev. Entomol. 2002; .47:123-141.

Berridge MJ, Lindley BD, Prince WT. Membrane permeability changes during stimulation of isolated salivary glands of *Calliphora* by 5-hydroxytryptamine. J Physiol. 1975; 244: 549-567.

Berridge MJ, Patel NG. Insect salivary glands: stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and adenosine-3',5'-monophosphate. Science. 1968; 162: 462–463.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248–254.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Buxton PA. The biology of a blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. Trans R Entomol Soc Lond. 1930; 78: 227-236.

Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. To be or not to be in nucleolus. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: E107–E112.

Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology.* 2003; 127: 87-93.

Chagas C. Nova Tripanosomíase Humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159-218.

Champagne DE, Nussenzveig RH, Ribeiro JM. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem.* 1995; 270: 8691-8695.

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraeve W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; 90: 278-279.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010; 115 (1-2): 5-13.

Cuba CAC. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31(2): 207-220.

Dale C, Beeton M, Harbison C, Jones T, Pontes M. Isolation, Pure Culture, and Characterization of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*,” an Intracellular Secondary Endosymbiont from the Hippoboscid Louse Fly *Pseudolynchia canariensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72 (4): 2997–3004.

Dan A, Pereira MH, Pesquero JL, Diotaiuti L, Beirão PS. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol.* 1999; 36 (6): 875-9.

Dias JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. Cad Saúde Pública. 2006; 22 (10): 2020-2021.

Dias, JCP. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 41-45.

Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. Cad Saúde Pública. 2007; 23 (1): 13-22.

Dias JCP, Borges-Dias R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. Cienc Cult. 1979; 31: 105-124.

Diotaiuti, L (Org.); Oliveira, MA (Org.); Santos, JP (Org.). Triatomíneos. Colaboradores: Alessandra Aparecida Guarneri, Ana Cristina Rena de Vitta, Bernardino Vaz de Melo Azeredo, Carlota Josefovicz Belisário, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, João Carlos Pinto Dias e Sílvia Ermelinda Barbosa. Belo Horizonte: [s.n.], 2008. 271 p. il. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/livro_triatomineos. Acesso em: 06 fevereiro 2011.

Dotson EM, Plikaytis B, Shinnick TM, Durvasula RV, Beard CB. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. Infect Genet Evol. 2003; 3: 103–110.

Douglas AE. Mycetocyte symbiosis in insects. Biol. Rev. 1989. 64 (4):409-434.

Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Taneja J, Kang A, Cordon-Rosales C, Richards FF, Whitham R, Beard CB. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. Med Vet Entomol. 1999a; 13:115–119.

Durvasula RV, Kroger A, Goodwin M, Panackal A, Kruglov O, Taneja J, Gumbs A, Richards FF, Beard CB, Cordon-Rosales C. Strategy for introduction of foreign genes into field populations of Chagas disease vectors. Ann. Entomol. Soc. Am. 1999b; 92: 937–943.

Durvasula RV, Sundaram RK, Kirsch P, Hurwitz I, Crawford CV, Dotson E, Beard CB. Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. 2008; 119(1): 94–98.

Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*. 2001; 105: 297–306.

Elia AJ, Ali DW, Orchard I. Immunochemical staining of tyrosine hydroxylase (TH)-like material in the ventral nerve cord of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J Insect Physiol*. 1994; 40: 671–683.

Evans PD. Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv Insect Physiol*. 1980; 15: 317–473.

Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*. 2000; 275: 12639–12650.

Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol*. 1994; 78: 287-293.

Gherna RL, Werren JH, Weisburg Q, Cote R, Woese CR, Mandelco L, Brenner. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1991; 41: 563–565.

Golodne DM, Monteiro RQ, Graça-Souza AV, Silva-Neto MCA, Atella GC. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*. 2003; 278: 27766–27771.

Gontijo ED, Santos SE. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. In: Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>>. Acesso em 20 jul. 2009.

Goodchild A J P. The bacteria associated with *Triatoma infestans* and some other species of Reduviidae. *Parasitology* 1955; 45(3-4):441-448.

Grindle N, Tyner JJ, Clay K, Fuqua C. Identification of *Arsenophonus*-type bacteria from the dog tick *Dermacentor variabilis*. *J. Invertebr. Pathol.* 2003; 83: 264–266.

Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge, D. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology.* 1987; 94: 475-484.

Guhl F, Marinkelle CJ. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1982; 76 (3): 361.

Harrington JS. Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology.* 1960; 50: 279-286.

Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug, *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res.* 1990; 76: 311-318.

Hellmann K, Hawkins RI. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus*. *Stal. Nature.* 1964; 201: 1008–1009.

Hellmann K, Hawkins RI. Prolixin-S and Prolixin-G: two anticoagulants from *Rhodnius prolixus*. *Stal. Nature.* 1965; 207: 265–267.

Heslop JP, Berridge MJ. Changes in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations during the actions of 5-hydroxytryptamine on an insect salivary gland. *Biochem J.* 1980; 192: 247-255.

Hill P, Campbell JA, Petrie IA. *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete: a microbiological, physiological and behavioural study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1976; 194:501-25.

Hudson L, Guhl F, De Sanchez N, Bridge D, Jaramillo CA, Young A. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology.* 1992; 96: 449-460.

Hypša V. Endocytobionts of *Triatoma infestans*: distribution and transmission. J. Invertebr. Pathol. 1993; 61: 32-38.

Hypša V, Dale C. In Vitro Culture and Phylogenetic Analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*,” an Intracellular Bacterium from the Triatomine Bug, *Triatoma infestans*. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47 (4): 1140-1144.

Insausti TC. Nervous system of *Triatoma infestans*. J Morphol. 1994; 221(3): 343-59.

Isawa H, Yuda M, Yoneda K, Chinzei Y. The Insect Salivary Protein, Prolixin-S, Inhibits Factor IXa Generation and Xase Complex Formation. J Biol Chem. 2000; 275 (9): 6636–6641.

Just F, Walz B. Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*: New data from light and electron microscopy. J Morphol. 1994; 220: 35–46.

Just F, Walz B. The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. J Exp Biol. 1996; 199: 407–413.

Kalvachova P, Hribalova V, Kodym P, Volf P. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol. 1999; 36: 341–344.

Kaufmann L, Schurmann F, Yiallourous M, Harrewijn P, Kayser H. The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on the locust (*Locusta migratoria*) and on an aphid (*Myzus persicae*). Comp Biochem Physiol. 2004; 138: 469–483.

Knipp M, Yang F, Berry RE, Zhang H, Shokhirev MN, Walker FA. Spectroscopic and functional characterization of nitrophorin 7 from the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* reveals an important role of its isoform-specific N-terminus for proper protein function. Biochemistry, 2007; 46 (46): 13254–13268.

Lacombe D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (4): 557-564.

Lake P, Friend WG. The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. J. Insect Physiol. 1968; 14(4): 543-562.

Lang I, Walz B. Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*. J Exp Biol. 1999; 202: 729–738.

Lange AB, Orchard I, Barrett FM. Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. 1989; 35: 393-399.

Lange AB, Orchard I, Lloyd RJ. Immunohistochemical and electrochemical detection of serotonin in the nervous system of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. Arch Insect Biochem Physiol. 1988; 8: 187–201.

Lavoipierre MMJ, Dickerson G, Gordon RM. Studies on the methods of feeding of blood sucking arthropods: I—the manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effect of the bite on human volunteers. Ann Trop Med Parasitol. 1959; 53: 235–252.

Lent CM, Dickinson NH. The neurobiology of feeding in leeches. Sci AM. 1988; 256: 98-103.

Lima-Oliveira APM. Estudo Citoquímico em Glândulas Salivares de Triatomíneos do Gênero *Rhodnius* [mestrado]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 1997.

Long TF, Murdock LL. Stimulation of blowfly feeding behaviour by octopaminergic drugs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80: 4159-4163.

Maddrell SHP, Lane NJ, Harrison JB, Gardiner BOC. DNA replication in binucleate cells of the Malpighian tubules of Hemipteran insects. Chromosoma, 1985; 91 (3-4): 201-209.

Marg S, Walz B, Blenau W. The effects of dopamine receptor agonists and antagonists on the secretory rate of cockroach (*Periplaneta americana*) salivary glands. *J Insect Physiol.* 2004; 50: 821–830.

Marinkelle, C.J. *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* stal in nature. *J Med Entomol.* 1968; 5 (4): 497-499.

Meirelles RM, Rodrigues IS, Steindel M, Soares MJ. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2003; 35 (2): 199-207.

Meirelles RMS, Henriques-Pons A, Soares MJ, Steindel M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol Res.* 2005; 97: 259-269.

Mello MLS. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas [dissertação - livre docência]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1976.

Mello MLS. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev Bras Pesqui Med Biol.* 1975; 8 (2): 101-107.

Mello MLS. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). *Cytologia.* 1971; 36 (1): 42-49.

Mello MLS, Recco-Pimentel SM. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios.* 1987; 52: 175-184.

Mesquita RD, Carneiro AB, Báfica A, Gazos-Lopes F, Takiya CM, Souto-Padron T, Vieira DP, Ferreira-Pereira A, Almeida IC, Figueiredo RT, Porto BN, Bozza MT, Graca-Souza AV, Lopes AHCS, Atella GC, Silva-Neto MAC. Trypanosoma cruzi Infection Is Enhanced by Vector Saliva through Immunosuppressant Mechanisms Mediated by Lysophosphatidylcholine. *Infect Immun.* 2008; 76: 5543-5552.

Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naiff RD, Souza AA, Povoá MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32: 1251-1259.

Miles PW. The saliva of Hemiptera. Adv Insect Physiol. 1972; 9: 183-255.

Miles PW. The salivary secretions of a plant-sucking bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dall.) (Heteroptera: Lygaeidae) - III origins in the salivary glands. J Insect Physiol. 1960; 4: 271-282.

Miles PW, Slowiak D. Transport of whole protein molecules from blood to saliva of a plant-bug. Experientia. 1976; 26: 611-612.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991; 43: 109 – 142.

Montfort WR, Weichsel A, Andersen JF. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. Biochim Biophys Acta. 2000; 1482: 110-118.

Moreira MF, Coelho HS, Zingali RB, Oliveira PL, Masuda H. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem Mol Biol. 2003;33: 23–28.

Nanya S, Bicudo HEMC. Variation of nucleolar area in fat tissue of *Drosophila mulleri* during development. Cytobios, 1995; 81: 73–86.

Nässel DR. Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. Prog Neurobiol. 1988; 30: 1–85.

Neto VA, Pasternak J. Chagas disease centenary. Rev Saude Publica. 2009; 43 (2): 381-382.

Noeske-Jungblut C, Kratzchmar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem*. 1994; 269: 5050–5053.

Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L, Schleuning WD. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem*. 1995; 270: 28629–28634.

Novak MG, Ribeiro JM, Hildebrand JG. 5-Hydroxytryptamine in the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* and its role in regulation of salivation. *J Exp Biol*. 1995; 198: 167–174.

Nunes PH, Camargo-Mathias MI. Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae). *Micron*. 2006; 37: 57–66.

Nussenzveig RH, Bentley DL, Ribeiro JM. Nitric oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol*. 1995; 198: 1093–1098.

Orchard I. Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol*. 2006; 144: 316–324.

Orchard I, Brugge VAT. Contractions associated with the salivary gland of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*: evidence for both a neural and neurohormonal coordination. *Peptides*. 2002; 23: 693–700.

Panzer F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Perez R, Suja JA, Scvortzoff E, Dujardin JP, Estramil E, Salvatella, R. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). *Genome*. 1992; 35: 1068-1074.

Parthasarathy R, Gopinathan KP. Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expr Patterns*. 2005; 5: 323–339.

Pearse AGE. Histochemistry. theoretical and applied. 3nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1972.

Pereira MH, Souza MEL, Vargas AP, Penido CM, Martins MS, Diotaiuti, L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). Acta Trop. 1996; 61: 255–261.

Perez R, Panzera F, Page J, Suja JA, Rufas JS. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chromosome Res. 1997; 5 (1): 47-56.

Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol. 1998; 64 (10): 3724–3730.

Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Silva EL. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brazil, an endemic region to Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31 (1): 99-102.

Reis MM, Meirelles RMS, Soares MJ. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Tissue Cell. 2003; 35: 393-400.

Ribeiro JMC. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis. 1995; 4 (3): 143-152.

Ribeiro JMC, Garcia ES. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. 1980; 26: 303–307.

Ribeiro JMC, Garcia ES. The role of saliva in feeding in *Rhodnius prolixus*. J Exp Biol. 1981; 94: 219–230.

Ribeiro JMC, Sarkis JFF. Anti-thromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. J Insect Physiol. 1982; 28: 655–660.

Ribeiro JMC, Marinotti O, Gonzales R. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. Br J Pharmacol. 1990; 101: 932–936.

Ribeiro JMC, Hazzard JMH, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. Science. 1993; 260: 539–541.

Ribeiro JMC, Nussenzveig RH. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. FEBS Lett. 1993; 330: 165-168.

Ribeiro JMC, Walker FA. High affinity histamine-binding and anti-histaminic activity of the salivary NO-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. J Exp Med. 1994; 180: 2251–2257.

Ribeiro JMC, Schneider M, Guimarães JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Biochem J. 1995; 308: 243–249.

Ribeiro JM, Schneider M, Isaias T, Jurberg J, Galvão C, Guimarães JA. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). J Med Entomol. 1998; 35(4): 599-610.

Ribeiro JMC, Francischetti IM. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. Annu Rev Entomol. 2003; 48: 73–88.

Rietdorf K, Lang I, Walz B. Saliva secretion and ionic composition of saliva in the cockroach *Periplaneta americana* after serotonin and dopamine stimulation, and effects of ouabain and bumetamide. J Insect Physiol. 2003; 46: 205–215.

Robertson HA. The innervation of the salivary gland of the moth, *Manduca sexta*. Cell Tissue Res. 1974; 148: 237–245.

Robertson HA. The innervation of the salivary gland of the moth, *Manduca sexta*: evidence that dopamine is the transmitter. J Exp Biol. 1975; 63: 413–419.

Rocha FF, Araujo RN, Silva LM, Gontijo NF, Pereira MH. Primary culture of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(2): 132-136.

Ross A, Novoa-Montero D. Comparability and reability of ELISA, immunofluorescence and indirect hemmaglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *J Infect Dis*. 1983; 168: 1581-1584.

Russell JA, Latorre A, Sabater-Munoz B, Moya A, Moran NA. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol*. 2003; 12: 1061–1075.

Saldaña A, Sousa OE, Örn A. Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panama: humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. *Scand J Immunol*. 1995; 42: 644-650.

Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: crossreaction among their immunogenic components. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996a; 91 (1): 81-82.

Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 1996b; 82 (2): 363-366.

Santos CM, Jurberg J, Galvão C, Lent H. Análise morfológica comparativa do complexo salivar dos Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Entomol Vect*. 1997; 4: 155-162.

Sarkis JJF, Guimarães JA, Ribeiro JMC. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochem J*. 1986; 233: 885–891.

Sauer JR, Mcswain JL, Bowman AS, Essenberg RC. Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol*. 1995; 40: 245–267.

Schmunis GA, Dias JCP. La reforma del sector salud, descentralización prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. *Cad Saúde Pública*. 2000; 16 (2): 117-123, 2000.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 2009; 110 (2-3): 88-100.

Serrão JE, Castrillon MI, Santos-Mallet JR, Zanuncio JC, Gonçalves TCM. Ultrastructure of the Salivary Glands in *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J Exp Biol.* 2008; 45(6): 991-999.

Silva LM, Botelho ACC, Nacif-Pimenta R, Martins GF, Alves LC, Brayner FA, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP. Structural analysis of the venom glands of the armed spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891): Microanatomy, fine structure and confocal observations. *Toxicon.* 2008; 51: 693–706.

Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res.* 1995; 73: 37–42.

Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, Dos Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol.* 2006; 52: 468–472.

Soares RP, Sant'anna MR, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 157–161.

Solari AJ. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae; Hemiptera). *Chromosoma.* 1979; 72: 225-240.

Subandiyah S, Nikoh N, Tsuyumu S, Somowiyarjo S, Fukatsu T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoolog. Sci.* 2000; 17: 983–989.

Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios.* 1999; 99: 113-122.

Thao ML, Baumann P. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.* 2004; 48:140–144.

Tovar D, Urdaneta – Morales S, Tejero F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, Tejera, 1920, study of the effects of the parasite on the vector. *Acta Cient Venez.* 1989; 40: 208-214.

Tsang PW, Orchard I. Distribution of FMRFamide-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J Comp Neurol.* 1991; 311: 17–32.

Tsuchida T, Koga R, Shibao H, Matsumoto T, Fukatsu T. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.* 2002; 11: 2123–2135.

Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol.* 1971; 17: 59-66.

Wenk P, Lucic S, Betz O. Functional anatomy of the hypopharynx and the salivary pump in the feeding apparatus of the assassin bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae, Heteroptera). *Zoomorphology.* 2010; 129: 225–234.

Wigglesworth VB. Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera, Triatominae). *Parasitology.* 1936; 28: 284-289.

Yuda M, Hirai M, Miura K, Matsumura H, Ando K, Chinzei Y. cDNA Cloning, Expression and Characterization of Nitric-oxide Synthase from the Salivary Glands of the Blood-Sucking Insect *Rhodnius prolixus*. *Eur J Biochem.* 1996; 242 (3): 807–812.

Zhang Y, Ribeiro JMC, Guimarães JA, Walsh PN. Nitrophorin-2: A Novel Mixed-Type Reversible Specific Inhibitor of the Intrinsic Factor-X Activating Complex. *Biochemistry.* 1998; 37 (30): 10681–10690.