

**LAMARA LAGUARDIA VALENTE ROCHA**

**MORFOLOGIA, ULTRA-ESTRUTURA E  
IMUNOHISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO DE  
*Triatoma vitticeps* (HEMIPTERA, TRIATOMINAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS, BRASIL  
2009**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R672m  
2009

Rocha, Lamara Laguardia Valente, 1958-  
Morfologia, ultra-estrutura e imunohistoquímica do  
intestino médio de *Triatoma vitticeps* (Hemiptera,  
Triatominae) / Lamara Laguardia Valente Rocha.  
– Viçosa, MG, 2009.  
xiii, 90f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 79-90.

1. Triatoma. 2. Intestinos - Morfologia. 3. Ultra-  
estrutura (Biologia). 4. Imunohistoquímica. 5. Biologia  
celular. 6. Zoologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22.ed. 595.79

**LAMARA LAGUARDIA VALENTE ROCHA**

**MORFOLOGIA, ULTRA-ESTRUTURA E IMUNOHISTOQUÍMICA  
DO INTESTINO MÉDIO DE *Triatoma vitticeps* (HEMIPTERA,  
TRIATOMINAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae..

APROVADA: 20 de março de 2009

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-orientador)

---

Prof. Gustavo Ferreira Martins

---

Prof<sup>a</sup>. Luciane Cristina Oliveira Lisboa

---

Prof. Stenio Nunes Alves

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Orientador)

*Dedico este trabalho a minha família, em especial ao Ronaldo e aos nossos filhos, Luiz Henrique, Sílvia e Gabriel, com todo amor e gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela certeza de sua presença, fidelidade e refúgio em todos os momentos de minha vida, a Ele toda glória, toda a honra e toda a minha gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

À Fundação Educacional de Caratinga, nas pessoas do Prof. Antônio Fonseca (Reitor do Centro Universitário de Caratinga) e Eugenio Maria Gomes (Pró-reitor de Planejamento, Administração e Finanças), pela confiança e investimento em mim, pelo exemplo de honestidade, ética, competência e compromisso com a Educação.

Ao professor e orientador José Eduardo Serrão pela dedicação, paciência, solidariedade, carinho e extrema competência e rigor na orientação desta tese.

Ao professor e co-orientador Clóvis Andrade Neves, pela valiosa e competente ajuda e orientação em vários momentos, inclusive em tempo de férias.

A professora e co-orientadora Teresa Cristina Monte Gonçalves, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ pela contribuição no envio de insetos utilizados inicialmente neste trabalho.

Ao Instituto René Rachou-FIOCRUZ pelo fornecimento dos insetos utilizados em todas as etapas de nosso trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, e a Dra. Cláudia Vanetti pelo apoio técnico.

Ao Prof. Antonio José Dias Vieira e aos meus alunos e orientados do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Caratinga, Elcineia Tavares Elias e Patrick Vieira da Costa pela valiosa contribuição na realização desta tese.

À todos os meus colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela amizade, pelos momentos difíceis ou alegres compartilhados.

As secretárias do DBG Beth, Diane, Rose e Salvadora pela boa vontade e disponibilidade em ajudar e aos técnicos Alex e Monteiro pela presteza e paciência ao ensinar e executar as tarefas que lhes coube neste trabalho.

Muito Obrigada!!!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos gerais.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. CAPÍTULO I:	12
3.1. Resumo.....	13
3.2. Introdução.....	15
3.3. Objetivos.....	17
3.4. Material e Métodos.....	18
3.5. Resultados.....	21
3.6. Discussão.....	49
3.7. Conclusão.....	53
4.0 CAPÍTULO 2:	54
4.1. Resumo.....	55
4.2. Introdução.....	57
4.3. Objetivos.....	61
4.4. Material e Métodos.....	62
4.5. Resultados.....	64
4.6. Discussão.....	72
4.7. Conclusão.....	76
5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79



## RESUMO

ROCHA, Lamara Laguardia Valente. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Morfologia, ultra-estrutura e imunohistoquímica do intestino médio de *Triatoma vitticeps* (Hemiptera, Triatominae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Teresa Cristina Monte Gonçalves.

Entre todos os animais, os insetos representam uma classe que conseguiu enorme sucesso na ocupação de vários nichos em diferentes ambientes na Terra. Este sucesso se deve, entre outros fatores, a adaptação a diferentes hábitos alimentares. Geralmente, o intestino dos insetos é dividido em intestino anterior, médio e posterior. O intestino médio é responsável por funções fundamentais no processo digestivo, como a síntese e secreção de enzimas, digestão e absorção de alimentos. Este trabalho descreve a morfologia, a ultra-estrutura e a ocorrência de células regenerativas e células endócrinas nas diferentes regiões do intestino médio do hemíptero hematófago *Triatoma vitticeps* em diferentes períodos após repasto sanguíneo. Vinte e sete insetos em diferentes estádios de desenvolvimento e de ambos os sexos tiveram os intestinos médios dissecados em diferentes períodos após a alimentação e foram avaliados em microscópios de luz e eletrônico de transmissão, bem como submetidos ao teste imunohistoquímico com anti-FMRFamida para evidenciação de células endócrinas. Cem campos para cada região do intestino médio de cada animal e em períodos diferentes após repasto foram utilizados para as análises morfométricas e para a contabilização do número de núcleos das células digestivas, das células endócrinas e das células regenerativas. As células digestivas se caracterizavam pela presença de microvilosidades apicais e invaginações basais além de um núcleo central desenvolvido. A membrana perimicrovilar já estava presente em todos os espécimens analisados. A porção anterior do intestino médio apresenta as células digestivas com gotas lipídicas, grânulos de glicogênio, labirinto basal desenvolvido associado a mitocôndrias sugerindo seu papel em processos de armazenamento e transporte de fluidos e íons. As células das regiões mediana e posterior do intestino médio são ricas em retículo endoplasmático rugoso, lisossomos, vesículas e grânulos com diferentes elétrondensidades. Além disso, as células da porção posterior do intestino médio são ricas em grânulos elétrondensos que se assemelham a hemozoína e mitocôndrias dispostas nas bases de microvilosidades sugerindo sua participação na digestão de sangue e absorção de

nutrientes. A semelhança entre o intestino médio do *T. vitticeps* com outros hemípteros sugere que estes surgiram a partir de um ancestral comum e que as características morfológicas do intestino médio relacionam-se mais a origem monofilética do que com o tipo de alimentação. Os resultados evidenciaram a presença de células enteroendócrinas do tipo aberta e positivas para FMRFamida no intestino médio de *T. vitticeps*. Eles também mostram a possível associação entre o ciclo alimentar, sexo e região do intestino médio com a frequência de células endócrinas, regenerativas e digestivas neste triatomíneo.

## ABSTRACT

ROCHA, Lamara Laguardia Valente. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Morphology, ultrastructure and immunohistochemistry of the midgut of *Triatoma vitticeps* (Hemiptera, Triatominae)**. Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisors: Clovis Andrade Neves and Teresa Cristina Monte Gonçalves.

The insects success is due, among other factors, to adaptation for different food resources. Usually, the gut of the insect is divided into foregut, midgut and hindgut. The midgut is responsible for key roles in the digestive process, the enzymes synthesis, digestion and absorption. This study describes the morphology, ultrastructure and the occurrence of regenerative and endocrine cells in different midgut regions of the hematophagous Hemiptera, *Triatoma vitticeps*, at different periods after blood meal. Twenty-seven adult insects of both sexes were dissected at different periods after feeding and the midguts were analyzed in light and transmission electron microscopes. One hundred fields for each midgut region (anterior, middle and posterior) for each animal and at different times after meal were used for morphometric analysis and for counting the number of nuclei of digestive, endocrine and regenerative cells. The digestive cells are characterized by the presence of apical microvilli, basal plasma membrane invaginations and central nucleus. The perimicrovillar membrane was present in all specimens analyzed. The anterior portion of the midgut showed digestive cells with lipid droplets, glycogen granules, developed basal labyrinth associated with mitochondria suggesting its role in processes of storage, fluid flux and ions exchange. The cells of middle and posterior regions of the midgut are rich in rough endoplasmic reticulum, lysosomes, vesicles and granules with different electron-densities. Moreover, cells of the posterior portion of the midgut are rich in electron-dense granules that are similar to hemozoin and mitochondria located at the base of microvilli suggesting its participation in blood digestion and absorption of nutrients. The similarity between the midgut of *T. vitticeps* with other Hemiptera suggests that they arose from a common ancestor and that the morphological features of the midgut is more related to monophyletic origin than the type of food. The results showed in the midgut occurrence of endocrine cells

characterized as the type open and positive for FMRFamide. They also show a possible association between the food cycle, sex and region of the midgut with the frequency of endocrine, digestive and regenerative cells in this Triatominae.

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1. Descrição geral do tubo digestivo de insetos:

O tubo digestivo dos insetos é dividido segundo sua origem embrionária, em três regiões distintas: intestino anterior ou estomodeu, intestino médio – ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeu. Cada compartimento tem uma função específica, assim o intestino anterior está envolvido nos processos de armazenamento e, algumas vezes na fragmentação de alimentos, já o intestino médio produz enzimas e absorve os produtos da digestão, sendo o material não digerido eliminado pelo intestino posterior, onde ocorre também absorção de sais e água (Cruz Landim, 1985, Downe, 1986; Terra *et al.*, 1990; Serrão & Cruz-Landim, 1995; Cruz-Landim *et al.*, 1996a; 1996b; Chapman, 1998; Nation, 2002; Serrão *et al.*, 2004; Jarial, 2005).

A parede do intestino médio é composta por epitélio de revestimento simples e por duas camadas musculares, a circular interna e a longitudinal externa. No epitélio deste segmento ocorrem três tipos celulares: células digestivas, células regenerativas e células endócrinas (Cruz Landim, 1985, Serrão & Cruz-Landim, 2000; Neves *et al.*, 2002).

O lúmen do ventrículo dos insetos, de uma maneira geral, é revestido por uma matriz extracelular denominada membrana peritrófica, que gera uma barreira permeável entre o bolo alimentar e o epitélio, estimulando os processos digestivos e protegendo a superfície do epitélio da abrasão mecânica, assim como ação de toxinas e patógenos (Tellam, 1996). De acordo com a sua origem, a membrana peritrófica pode ser classificada em tipo I, quando sintetizada ao longo de todo o tubo digestivo originando um produto de delaminação contínua, e a do tipo II, sintetizada por determinados tipos celulares na região da cárdia (Wigglesworth, 1930; Peters, 1992). Quanto a composição as membranas peritróficas contêm geralmente em sua matriz, de 3 a 13% de quitina, associada a complexos de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas (Lehane, 1997).

## 1.2. Principais tipos celulares do epitélio do intestino médio de insetos:

### 1.2.1. Células Digestivas:

As células digestivas ou principais são colunares, podendo apresentar algumas modificações estruturais, conforme o estado fisiológico do inseto. Desta maneira, células ativas apresentam o núcleo volumoso e com evidente polaridade determinada pela distribuição diferenciada das estruturas celulares em seu citoplasma. Assim, em sua região basal ocorrem dobras associadas a mitocôndrias, na região mediana se alojam o núcleo, o retículo endoplasmático granuloso, o complexo de Golgi e várias vesículas de secreção. Na região apical estão presentes microvilosidades, vesículas de secreção, microfilamentos e mitocôndrias. As células digestivas são unidas por junções septadas e participam da síntese de enzimas digestivas, digestão e absorção de substância (Downe, 1986; Terra *et al.*, 1990; Chapman, 1998).

As membranas das células digestivas possuem modificações representadas pelas microvilosidades e dobras basolaterais, que participam de processos fisiológicos importantes para o inseto (Terra *et al.*, 2006). Desta forma, as microvilosidades das células digestivas dos insetos se assemelham morfológicamente a dos vertebrados, apresentando um feixe paralelo de filamentos de actina que se unem através de ligações cruzadas com vilina e fimbrina formando o centro do microvilos (Bautz, 1989; Bonfanti *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1995, Dallai *et al.*, 1998). As membranas das microvilosidades podem apresentar papéis funcionais diferentes ao longo do epitélio do intestino médio e entre os diversos taxa de insetos, se envolvendo com digestão terminal na superfície celular, absorção, homeostase de íons, sinalização e mecanismos de secreção de enzimas digestivas específicas (Terra *et al.*, 2006).

As dobras das membranas basolaterais de células do intestino médio dos insetos formam longos e finos canais com partículas aderidas em seu lado citoplasmático (Terra *et al.*, 1988) ou modificam-se em canais curtos e ramificados com pequenos espaços extracelulares (Santos *et al.*, 1984). Supostamente estas dobras de membrana contribuem para que a célula concentre solutos no compartimento gerando um gradiente osmótico entre o compartimento e o lúmen, favorecendo a absorção de água (Terra *et al.*, 2006). Além de seu envolvimento com o transporte trans-epitelial de solutos e água, as membranas basolaterais

podem ter outras funções como a digestão de trealose da hemolinfa (Azuma & Yamashita, 1985).

### 1.2.2. Células regenerativas:

As células regenerativas distribuem-se de forma isolada ou em ninhos por entre a base das células digestivas e apresentam características de células indiferenciadas. Estas células originam novas células para a manutenção da integridade do epitélio do intestino médio (Billingsley e Downe, 1986b; Cruz-Landim *et al.*, 1996b; Chapman, 1998; Serrão & Cruz Landim, 2000; Nation, 2002; Neves *et al.*, 2003; Jarial, 2005; Martins *et al.*, 2006).

Segundo Ohlstein & Spradling (2007) o epitélio do intestino médio de *Drosophila* contém células-tronco intestinais multipotentes que se distribuem de maneira esparsada ao longo da membrana basal e que podem gerar tanto células digestivas como células endócrinas. No interior do citoplasma dessas células observou-se a presença de vesículas ricas na proteína Delta, que se liga a proteínas Notch expressas na membrana celular, ativando a via de diferenciação celular.

Schonhoff *et al* (2004) ao descrever os processos de desenvolvimento e diferenciação de células endócrinas no intestino de mamíferos, sugerindo que estes eventos se assemelham ao modelo descrito para *Drosophila*, afirmando que este processo foi altamente preservado durante a evolução dos metazoários. Sugerem também que, na diferenciação de células digestivas e endócrinas a partir de células-tronco em mamíferos, ocorrem mecanismos diferentes na expressão gênica. Desta maneira, a ativação da via da proteína Notch determina o aparecimento de células comprometidas com a diferenciação. Além disso, se ocorrer também nesta linhagem de células comprometidas com a diferenciação a expressão do gene *Math1*, as células originarão células secretoras como as células de Pannet. A expressão conjunta dos genes *Math1* e *Ngn3* nas células secretoras conduzirá a diferenciação para células endócrinas, e a diversidade deste tipo celular é garantida a partir do controle de outros genes como *Beta2*, *Pax4* e *Pax 6*.

Martins *et al.* (2006) testaram a hipótese de que durante a metamorfose, o epitélio do intestino médio de operárias de abelhas da subespécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* resultassem da proliferação de células regenerativas durante o estado de pupa. Verificaram que a proliferação de células regenerativas resultou no aumento das populações de células

regenerativas e não na formação de novas células digestivas. Esse resultado indica que a proliferação das células regenerativas não foi suficiente para re-estabelecer os ninhos de células regenerativas e ao mesmo tempo gerar novas células digestivas, rejeitando assim a hipótese que em indivíduos adultos as células do epitélio do intestino médio originam-se de células regenerativas que proliferam durante a metamorfose.

Illa-Bochaca & Montuenga (2006) descreveram em *Locusta migratoria* a existência de dois tipos de células-tronco, aquele que engloba células localizadas no centro do ninho e o outro tipo caracterizado como células amplificadoras em trânsito. A partir de diferentes desenhos experimentais foram avaliadas a dinâmica da proliferação e diferenciação das células epiteliais do intestino médio a partir de parâmetros como tipos de nichos, tempo do ciclo celular, destino das células marcadas com 5-Bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) e com Anti-FMRamide. Concluiu-se que existem três tipos de células-tronco, diferenciadas pelo tamanho do núcleo, posição em relação ao nicho e pelo tempo gasto no ciclo de proliferação e diferenciação. Afirmam também que essas células regenerativas podem originar todos os tipos celulares que formam o epitélio do intestino médio.

Diferentes modelos experimentais podem ser observados em trabalhos que descrevem os processos relacionados à substituição de células do epitélio intestinal, não só em insetos, mas também em outros animais como os mamíferos (Schonhoff *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2006; Illa-Bochaca & Montuenga, 2006). Entre estes modelos, o intestino delgado de camundongos representa excelente escolha para o estudo da proliferação e diferenciação das células-tronco, uma vez que é revestido por epitélio simples, que se dobra para formar criptas e vilosidades, que demonstram ser fisiologicamente e morfológicamente diferentes, com as vilosidades se projetando para o lúmen intestinal e cumprindo o papel de absorver nutrientes, enquanto que as criptas se escondem em dobras protegidas e representam locais que guardam as células-tronco (Slorach *et al.*, 1999).

Segundo Potten & Loeffler (1990) as células-tronco do intestino delgado de mamíferos residem na base das criptas do epitélio e se dividem para gerar células filhas que migram através da entrada da cripta até a extremidade das vilosidades. Essas células filhas chamadas de células amplificadoras em trânsito se proliferam e diferenciam-se durante a migração. Ao atingir o ápice das vilosidades as células diferenciadas são eliminadas por apoptose sendo liberadas para o lúmen (Hall *et al.*, 1994; Shibahara *et al.*, 1995). Estes eventos estabelecem uma hierarquia entre as células-tronco, de maneira que, quanto mais distantes da base das

criptas menor é o poder de proliferação e de pluripotência (Potten & Loeffler, 1990). Através desses processos altamente regulados de diferenciação, proliferação e migração celular se garante a integridade da barreira e a manutenção da homeostase intestinal (Slorach *et al.*, 1999).

### 1.2.3. Células endócrinas:

O intestino médio dos insetos é considerado a principal glândula endócrina, devido à presença do grande número de células endócrinas dispersas entre as células epiteliais do intestino (Zitnan *et al.*, 1993). Segundo Endo & Nishiitsutsuji-Uwo (1981) as células endócrinas observadas em insetos como baratas e várias espécies de lepidópteros, correspondem ultra-estruturalmente e imunohistoquimicamente as células endócrinas do sistema digestório de vertebrados.

As células endócrinas localizadas no trato gastrointestinal de vertebrados representam a maior população de células produtoras de hormônios no corpo (Rehfeld, 1998). Além disso, distribuem-se de forma esparsa e isoladas, entre os outros tipos celulares que revestem o intestino, correspondendo a 1% do total das células que compõe o epitélio intestinal de camundongos (Cheng & Leblond, 1974).

Conforme revisto por Flemstrom & Sjoblom (2005), as células endócrinas de vertebrados compreendem uma população variada e complexa de células do epitélio intestinal produtoras de hormônios e peptídeos e que estão em contato íntimo com o lúmen, o que lhes permite agir como sensores do conteúdo de nutrientes, além de perceber alterações nos níveis do pH e na osmolaridade.

As primeiras descrições morfológicas dessas células foram feitas no estômago de várias espécies de vertebrados e caracterizavam-se histologicamente por corarem-se de marrom com soluções contendo dicromato (Pentilla, 1966; Lewin, 1986).

Várias classificações para células endócrinas foram propostas a partir de suas propriedades de coloração, caracterizando-se como “células acidófilas” (revisado por Lechago, 1987) e “células amarelas” (Pentilla, 1966). Através de técnicas histoquímicas pode-se posteriormente caracterizá-las como células argentafins, pela capacidade de alguns destes tipos celulares, de incorporarem e precipitarem sais de prata ou pela possibilidade de outras

células endócrinas chamadas de argirófilas, de somente absorver sais de prata e serem identificadas através de elementos redutores (Lechago, 1987).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias como radioimunoensaio, o isolamento e síntese de peptídeos pelo advento da cromatografia e do espectrofotômetro, da microscopia eletrônica, da imunohistoquímica e das técnicas de biologia molecular, foi possível um grande avanço na identificação dos diferentes tipos de células endócrinas no trato gastrointestinal de diferentes espécies. Isso permitiu caracterizá-las conforme a natureza de seus grânulos, além de contribuir para a compreensão de sua participação em processos fisiológicos e patológicos (Santos & Zocoloto, 1996).

As semelhanças ultra-estruturais entre os neurônios e as células endócrinas em gastrointestinais de vertebrados e a presença de marcadores de diferenciação neuronal, evidenciadas através de técnicas de imunohistoquímica, resultou na classificação dessas células como pertencentes ao grupo de células APUD. Assim, acreditou-se durante certo tempo que estas teriam se originado da crista neural, no entanto, atualmente se aceita que surgiram do endoderma e sua diferenciação ocorre a partir das células-tronco localizadas no fundo das criptas intestinais, através de um mecanismo controlado pela via de sinalização Notch, envolvendo diferentes genes e fatores de transcrição como Math 1, NGN3, BETA2, Pax4 e Pax6 (Schönhoff *et al.*, 2004).

Atualmente a classificação das células endócrinas se faz através da técnica de imunohistoquímica a fim de identificar seus componentes hormonais (seus próprios produtos de secreção) e componentes não hormonais armazenados no seu citoplasma. A origem das células endócrinas a partir de uma célula tronco multipotente é sugerida devido a evidências como a capacidade das células endócrinas de produzirem diferentes compostos reguladores e a co-expressão de diferentes tipos desses peptídeos por células endócrinas, conforme se localizem nas vilosidades ou no fundo das criptas (Schönhoff *et al.* 2004).

Morfologicamente as células endócrinas podem ser classificadas em abertas ou fechadas, sendo caracterizadas por apresentarem núcleo com cromatina frouxa e grânulos de secreção na região basal do citoplasma. Estudos envolvendo técnicas de imunohistoquímica têm revelado que estas células endócrinas mostram marcação positiva para uma variedade de famílias de neuropeptídeos, incluindo peptídeos relacionados a RF-amida (Zitnan *et al.*, 1993; Serrão & Cruz-Landim, 1996; Lange & Orchard, 1998; Neves *et al.*, 2002) e sulfaquininas (Nachman *et al.*, 1997). O papel biológico desses peptídeos não está muito

claro, embora seja considerado que sua liberação possa estar relacionada de algum modo com mudanças no estado fisiológico em decorrência da alimentação, privação alimentar e parasitismo (Zitnan *et al.*, 1995; Zudaire *et al.*, 1998; Lange, 2001; Hill & Orchard 2004; Bede *et al.*, 2007).

Diferentes autores apontam para a ocorrência de células endócrinas no intestino médio de hemípteros, como Billingsley & Downe (1986b), que descrevem a sua ultra-estrutura. Segundo esses autores, as células endócrinas em *R. prolixus* localizam-se nas regiões média e posterior do intestino médio, distribuindo-se de forma esparsa entre as células digestivas e regenerativas, sem formar grupos e sem se associarem aos ninhos das células regenerativas. Além disso, esses autores classificaram essas células como do tipo fechado, onde não se viam microvilosidades e nem labirinto basal. Sua identificação ao microscópio eletrônico foi feita a partir da presença de vesículas secretórias de densidade intermediária concentradas na região basal do citoplasma, numerosas vesículas maiores além de vacúolos elétron-opacos na região apical. Observou-se também em sua ultra-estrutura a presença de complexo de Golgi bem desenvolvido, além de mitocôndrias, ribossomos livres, RER e figuras de mielina no citoplasma da célula.

Azevedo (no prelo) descreve as células endócrinas em outro heteroptera hematófago da espécie *Cimex hemipterus* como do tipo aberto, contendo em seu citoplasma grânulos com elétron-densidade média e mitocôndrias, além de vacúolos elétron-luscentes e figura de mielina na porção basal.

As células endócrinas de insetos parecem cumprir importante papel no controle do peristaltismo, na digestão, no crescimento e reprodução de insetos (Sehnal & Zitnan, 1996). O peptídeo FMRFamida produzido pelas células endócrinas e por terminações nervosas que alcançam o intestino médio podem agir de forma parácrina ou ser liberados na hemolinfa onde vão alcançar vários órgãos, entre eles o oviduto das fêmeas onde modula a contração muscular para a ovoposição (Sevala *et al.*, 1992; 1993).

Outros peptídeos reguladores também foram identificados em insetos, como os primeiros peptídeos sulfatados de invertebrados, as leucosulfaquininas, que foram isoladas de extratos da cabeça de baratas *Leucophea maderae*, onde agiam na contração do intestino posterior deste inseto (Nachman *et al.*, 1986a e b). Posteriormente, outros membros da família das sulfaquininas foram isolados de outros insetos, sendo que todos estes mostram uma

sequência de heptapeptídeos no C-terminal (DYSO3HGHRF-NH<sub>2</sub>) (Cook & Holman, 1978; Duve *et al.*, 1995).

As sulfaquininas tem semelhanças estruturais e fisiológicas aos peptídeos gastrina e colescistocinina (CCK) de vertebrados. O C-terminal comum às sulfaquininas mostra sequências homólogas com gastrina e CCK. Estes peptídeos são conhecidos por estimular a contração de músculos lisos bem com a secreção da enzima amilase em mamíferos. Em analogia, as sulfaquininas estimulam as contrações do intestino posterior de baratas e estimulam a liberação da enzima amilase no intestino médio de *Opisina arenosella* (Nachman *et al.*, 1997). Comparável ao efeito de saciedade da CCK em mamífero, as sulfaquininas inibem significativamente a vontade de se alimentar em *Schistocerca gregaria* e *Blatella germanica* (Maestro *et al.*, 2001; Wei Z *et al.*, 2000).

#### 1.2.4. Tubo digestivo em hemípteros:

Segundo Wigglesworth (1943), o intestino médio dos hemípteros pode ser dividido em três regiões ao se considerar a cor da parede do intestino e de seu conteúdo após ingestão do alimento. Dessa forma a cor vermelha identifica ausência da digestão do sangue, que é então armazenado na região anterior do intestino médio. O conteúdo alimentar mais acinzentado caracteriza a ocorrência de digestão química e será observado nas regiões média e posterior do intestino médio. Entretanto, existem diferentes propostas para a divisão do intestino médio de hemípteros, ao se considerar aspectos morfofuncionais. Neste sentido, Billingsley (1990), ao considerar a resposta das células do intestino médio à ingestão de sangue, considera que essa região do intestino de hemípteros se divide em região anterior ou estômago e região posterior ou intestino. Gonçalves (1985) descreve a anatomia do tubo digestivo de *T. vitticeps*, considerando duas regiões distintas: pró-mesêntero ou ventrículo quilífero e pós-mesêntero ou intestino. Segundo Silva *et al.* (1995), ao descrever a origem, função e organização da membrana microvilar no intestino médio do hemíptero *Dysdercus peruvianus*, considera o intestino dividido em três compartimentos principais (V1 - V3) e uma pequena região V4, que liga o intestino médio ao intestino posterior.

A região anterior do intestino médio, embora não seja o local de digestão de proteínas, não pode ser visto como um local simplesmente de armazenamento, pois aspectos ultra-estruturais sugerem sua relação com diurese e regulação de íons, hemólise, digestão de

carboidratos, e processamento de lipídeos (Barrett, 1982, Azambuja *et al.*, 1983; Ribeiro *et al.*, 1984, Billingsley *et al.*, 1986a, Grilo *et al.*, 2007).

A região mediana do intestino médio é local de síntese e secreção de proteases digestivas, ocorrendo digestão inicial de hemoglobina, pela ativação de catepsinas B e D, aminopeptidases, carboxipeptidases e outras enzimas hidrolíticas. As células digestivas desta região do intestino médio contêm vesículas secretoras ricas em enzimas, além da presença de RER e complexo de Golgi. O núcleo e todas as organelas presentes nestas células sofrem mudanças após a alimentação, observando-se fenômenos relativos a endoploidia nos núcleos das células digestivas e alteração na área, densidade e volume do retículo endoplasmático, complexo de golgi, lisossomos e vesículas (Billingsley, 1990).

A região posterior do intestino médio está ativamente envolvida na digestão de sangue, sintetizando também enzimas, sendo o principal sítio de absorção de nutrientes. Neste sentido, as células digestivas possuem maior área de superfície luminal, com maior densidade de mitocôndrias e estoque de glicogênio (Billingsley *et al.*, 1985; 1986a; 1988).

Conforme revisto por Terra (1988) e Billingsley (1990), quando o sangue alcança o lúmen da região anterior do intestino médio, a água e íons atravessam o epitélio transportador e as hemáceas sofrem hemólise, graças à presença de fatores hemolíticos. A hemoglobina será digerida no lúmen da região posterior do intestino médio, por ação de catepsinas B e D e pelas carboxipeptidases. Então, os oligopeptídeos resultantes desta quebra, ao alcançarem o espaço perimicrovilar sofrerão lise pela ação de dipeptidases aderidas à membrana das microvilosidades, e os produtos finais desta lise serão absorvidos. O grupo heme resultante da digestão da hemoglobina representa sério risco para o hemíptero hematófago, devido à produção de radicais livres que afetam o metabolismo do inseto. Parte dos radicais livres pode permanecer presa a membrana perimicrovilar, caracterizando um processo de detoxificação (Silva Jr. *et al.*, 2006).

A organização estrutural da parede do intestino médio de hemípteros, assim como as células que o compõem, é semelhante ao descrito para outros insetos. No entanto, a sua superfície luminal é revestida por um sistema de membranas (camadas de membrana celular externa ou membrana perimicrovilar) que se dispõem formando duas camadas separadas por uma camada elétron-densa de espessura constante, sendo uma interna (membrana plasmática apical) e outra externa (membrana apical luminal) voltada para a luz. A membrana perimicrovilar é rica principalmente em lipídeos, assemelhando-se à mielina e seu papel

biológico é semelhante ao que se descreve para a membrana peritrófica dos demais insetos (Billingsley, 1990, Terra *et al.*, 2006).

As membranas perimicrovulares supostamente são formadas a partir da fusão de vesículas de membrana dupla que se originam no Golgi, de maneira que sua membrana externa se funde com a membrana plasmática das microvilosidades e sua membrana interna funde-se à membrana perimicrovilar (Terra *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 1995). Nos hemípteros hematófagos, a membrana perimicrovilar é sintetizada algumas horas após o repasto sanguíneo. Sendo que com seis dias ela está completa e a partir de 12 dias tem início a sua degeneração (Billingsley & Downe, 1985; Ferreira *et al.* 1988).

Parasitas e vírus de importância médica e veterinária habitam o intestino médio de insetos que se alimentam de sangue e que atuam como vetores potenciais na transmissão de doenças. Estudos relativos ao intestino médio e suas interações com parasitos são importantes para o entendimento tanto da fisiologia do inseto quanto da doença por ele transmitida, contribuindo para o sucesso na intervenção do ciclo de vida do parasita (Billingsley, 1990).

Embora progressivamente tem-se conseguido controlar a doença de Chagas, 16 milhões de pessoas na América do Sul e América Central se encontram ainda infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Camargos *et al.*, 2004). Esse protozoário flagelado, apresenta ciclo evolutivo que determina a passagem por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hemípteros, hematófagos, comumente chamados de barbeiros, que pertencem aos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Reduviidae: Triatominae) (Coura, 2003).

A maioria dos trabalhos relacionados à morfologia interna do intestino médio de triatomíneos é representada por estudos que utilizam principalmente *R. prolixus* e *T. infestans* como modelos de análise pela sua importância como vetores da Doença de Chagas. No entanto, trabalhos mais recentes alertam para o risco que representa para a saúde pública o processo de domiciliação de algumas espécies silvestres como *T. vitticeps*, que se distribui em quatro estados brasileiros: Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Dias *et al.*, 1989; Gonçalves *et al.*, 1998, 2000; Lorosa *et al.*, 2003; Galvão *et al.*, 2003; Lorosa *et al.*, 2008).

Desta maneira, diante da escassez de trabalhos envolvendo a morfologia do intestino médio de *T. vitticeps* e considerando também a influência da presença do sangue e do tempo após repasto na estrutura e fisiologia do intestino médio descrito por diferentes autores em

hemípteros como *Rhodnius prolixus* (Billingsley *et al*, 1985, 1986 e 1990) e *Cimex hemipterus* (Azevedo *et al.*, no prelo), torna-se relevante o desenvolvimento de trabalhos que considerem em seu modelo experimental estes aspectos.

### 1.3. OBJETIVOS:

#### 1.3.1. Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo descrever aspectos da morfofisiologia do intestino médio de *T. vitticeps* submetido a diferentes períodos de jejum alimentar, contribuindo assim para compreensão dos processos digestivos neste vetor da doença de Chagas.

#### 1.3.2. Objetivos específicos:

- a. Descrever a estrutura e ultraestrutura das células digestivas dos diferentes compartimentos do intestino médio de *T. vitticeps* em diferentes períodos após repasto sangüíneo.
- b. Identificar aspectos da morfofisiologia das células digestivas com uso de diferentes técnicas de histoquímica.
- c. Identificar a presença de células endócrinas através de técnicas de imunohistoquímicas.
- d. Determinar a freqüência de células regenerativas, células digestivas e endócrinas e suas possíveis relações com o tempo de privação alimentar, região do intestino médio e sexo dos indivíduos.

# CAPÍTULO 1

**Aspectos morfológicos do intestino médio de *Triatoma vitticeps*  
(Stal, 1859) em diferentes períodos de jejum alimentar.**

## RESUMO

*Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) é um hemíptero hematófago que, apesar de ser considerado silvestre, vem demonstrando capacidade de colonização de domicílios e de transmissão da Doença de Chagas. Este trabalho descreveu a morfologia do intestino médio de *Triatoma vitticeps* e as possíveis influências do ciclo alimentar em sua estrutura. Foram estudados quinze animais adultos, de ambos os sexos e em jejum alimentar durante três, sete, 20 e 25 dias. De uma maneira geral as células digestivas são caracterizadas pela presença de microvilosidades apicais e invaginações basais além de um núcleo central desenvolvido. A membrana perimicrovilar foi evidenciada em todos os insetos analisados. A porção anterior do intestino médio apresenta as células digestivas com gotas lipídicas, grânulos de glicogênio, labirinto basal desenvolvido associado a mitocôndrias sugerindo seu papel em processos de armazenamento e transporte de fluidos e íons. As células das regiões mediana e posterior do intestino médio são ricas em retículo endoplasmático rugoso, lisossomos, vesículas e grânulos com diferentes eletron-densidades. Além disso, as células da porção posterior do intestino médio são ricas em hemozoína e mitocôndrias dispostas nas bases de microvilosidades sugerindo sua participação na digestão de sangue e absorção ativa de nutrientes. A semelhança entre o intestino médio do *Triatoma vitticeps* com outros hemípteros sugere que estes surgiram a partir de um ancestral comum e que as características morfológicas de seu intestino médio descritas, relacionam-se mais com aspectos da filogenia do que ao tipo de alimentação.

**Palavras Chaves:** *Triatoma vitticeps*, células digestivas, ultraestrutura e citoquímica.

## ABSTRACT

*Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) is a hematophagous Hemiptera that, although being considered wild, can be found in households being a potential Chagas' disease vector. This work describes the morphology of the midgut of *Triatoma vitticeps* and possible influences of the food cycle in their structure. We studied fifteen adults of both sexes and in insects maintained in starvation for three, seven, 20 and 25 days. In general the digestive cells are characterized by the presence of apical microvilli, basal invaginations and central nucleus. The perimicrovillar membrane was found in all insects examined. The anterior portion of the midgut shows digestive cells with lipid droplets, glycogen granules, developed basal labyrinth associated with mitochondria suggesting its role in processes of storage and transportation of fluids and ions. The cells of median and posterior regions of the midgut are rich in rough endoplasmic reticulum, lysosomes, vesicles and granules with different electron-densities. Moreover, cells of the posterior portion of the midgut are rich in hemozoyn and mitochondria localized in basal region of microvilli suggesting its participation in blood digestion and absorption of active nutrients. The similarity between the midgut of *Triatoma vitticeps* and other hemipteras suggests that they arose from a common ancestor and that the morphological characteristics of the midgut described, is more related to aspects of the phylogeny than the type of food.

**Key words:** *Triatoma vitticeps*, digestive cells, ultrastructure.

## 1. INTRODUÇÃO

A parede do intestino médio dos insetos é composta por um epitélio de revestimento e por duas camadas musculares, a circular interna e a longitudinal externa. No epitélio digestivo ocorrem três tipos celulares: células digestivas, células regenerativas e células endócrinas (Cruz Landim, 1985, Downe, 1986; Terra *et al.*, 1990; Chapman, 1998; Nation, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 1996a e b; Serrão & Cruz-Landim, 2000; Neves *et al.*, 2002; Jarial, 2005, Martins *et al.*, 2006).

Segundo Wigglesworth (1943), o intestino médio dos hemípteros hematófagos pode ser dividido em três regiões ao se considerar a cor da sua parede e de seu conteúdo após ingestão do alimento. Dessa forma a cor vermelha identifica ausência da digestão do sangue, que é então armazenado na região anterior do intestino médio. O conteúdo alimentar acinzentado caracteriza a ocorrência de digestão química e é observado nas regiões mediana e posterior do intestino médio. Entretanto, existem diferentes propostas para a divisão do intestino médio de hemípteros ao se considerar aspectos morfofuncionais, o que se deve a variação de hábitos alimentares nesta ordem. Billingsley (1988) divide o intestino médio de hemípteros em duas regiões, o intestino médio anterior ou estômago e intestino médio posterior ou simplesmente intestino, que se apresenta segmentado em intestino anterior e intestino posterior. Já para Gonçalves (1985) o intestino médio dos triatomíneos divide-se em promesêntero ou ventrículo quilífero e pós-mesêntero ou intestino. Guedes *et al.* (2007) relatam que o intestino médio de hemípteros zoofitófagos está dividido em uma região anterior dilatada, uma mediana tubular e uma posterior dilatada.

Billingsley (1988) afirma que a região anterior do intestino médio está envolvida principalmente com o transporte de íons e água, mantendo o equilíbrio eletrolítico, além disso ela participa da digestão de carboidratos e representa importante sítio para o armazenamento de lipídeos. Na região mediana do intestino médio ocorrem atividades de síntese e secreção de enzimas enquanto que na região posterior há digestão de nutrientes como as proteínas, absorção e armazenamento de compostos como o glicogênio.

A parede do intestino médio de hemípteros, assim como as células que o compõem, é semelhante ao descrito para outros insetos. No entanto, a sua superfície luminal é revestida por membrana perimicrovilar, que se dispõe entre o lúmen e a membrana plasmática das microvilosidades. Segundo Lane & Harrison (1979), as microvilosidades são revestidas por

membrana perimicrovilar, de maneira que, entre elas se observa um espaço ocupado por colunas que se dispõem de forma oblíqua. A membrana perimicrovilar tem função semelhante a da membrana peritrófica dos demais insetos (Billingsley, 1990, Terra *et al.*, 2006).

Entre os hemípteros existem representantes de interesse para o homem, como aqueles considerados como pragas na agricultura e outros que exercem o papel de vetores em diferentes patologias. Trabalhos sobre o intestino médio, como aqueles que estudam a inibição de enzimas ou proteínas da membrana perimicrovilar envolvidas em processos como digestão e adesão do patógeno, podem contribuir para a melhoria da saúde pública. Já que a interferência nestes mecanismos pode refletir na sobrevivência do parasito e do próprio vetor, diminuindo o sucesso na invasão dos ambientes antrópicos, além de significar benefícios ecológicos, ao se evitar o uso em longo prazo de fitossanitários que alteram o equilíbrio ambiental (Damasceno-Sá, 2007).

A maioria dos trabalhos disponíveis sobre a morfologia do intestino médio de triatomíneos é representada por estudos que utilizam principalmente como modelos *R. prolixus* e *T. infestans*, pela sua importância como vetores para a doença de Chagas. No entanto, trabalhos mais atuais têm alertado para o risco que representa à saúde pública a domiciliação de algumas espécies silvestres como o *Triatoma vitticeps* (Lorosa *et al.*, 2003, Gonçalves *et al.*, 2000).

O presente trabalho pretendeu descrever a morfologia do intestino médio de *Triatoma vitticeps* submetido a diferentes períodos de jejum alimentar, contribuindo para a compreensão dos processos digestivos nestes hemípteros.

## 1.2. OBJETIVOS:

### 1.2.1 Objetivo geral:

Descrever a estrutura e a ultraestrutura do intestino médio de *T. vitticeps* em diferentes períodos de privação alimentar.

### 1.2.2 Objetivos específicos:

- a. Descrever a estrutura e ultraestrutura das células digestivas dos diferentes compartimentos do intestino médio de *T. vitticeps* em diferentes períodos após repasto sangüíneo.
- b. Identificar aspectos da morfofisiologia das células digestivas com uso de diferentes técnicas de histoquímica.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais:

Adultos de ambos os sexos de *Triatoma vitticeps* foram cedidos pelo Instituto Renné Rachou – FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais. Esses animais foram mantidos em colônias no Laboratório de Entomologia do Centro Universitário de Caratinga, a 28 °C e umidade relativa de 60%.

Após 15 dias de jejum, os insetos foram alimentados em ratos (*Rattus norvegicus*) anestesiados e três, sete, 20 e 25 dias após a alimentação foram dissecados em solução fisiológica para insetos (NaCl 125 mM) e o intestino médio dividido nas regiões anterior, mediana e posterior, conforme figura 1. A divisão destes animais em grupos para as diferentes técnicas encontra-se registrada na tabela 1.

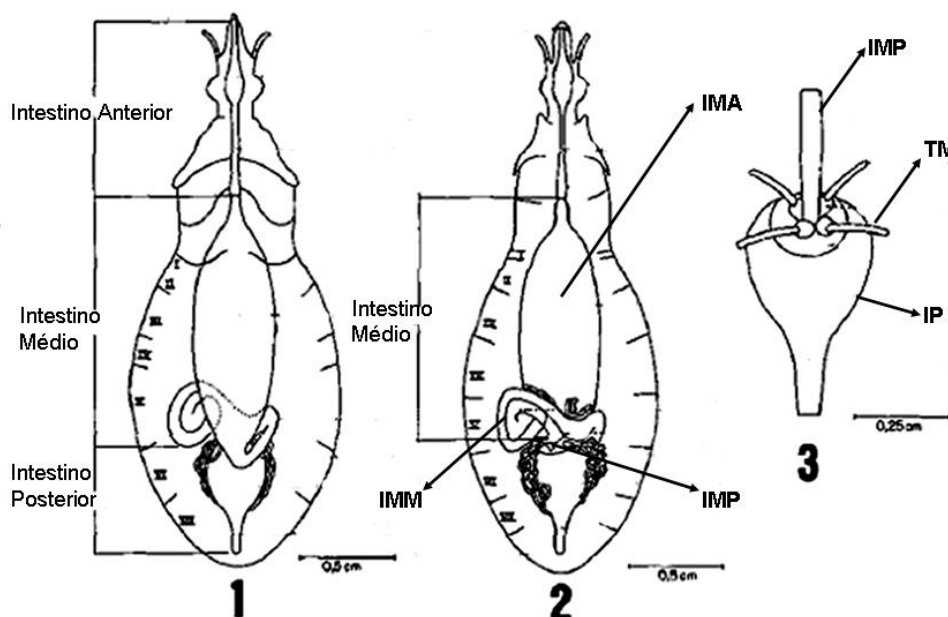


Figura 1 - O trato digestivo de *Triatoma vitticeps*: 1- Vista dorsal do intestino, mostrando a divisão do tubo digestivo; 2- Vista ventral indicando os compartimentos do intestino médio, IMA – Intestino médio anterior, IMM – Intestino médio mediano e IMP – Intestino médio posterior; 3- Detalhe da inserção da região posterior do intestino médio na ampola retal do intestino posterior e a localização dos quatro túbulos de Malpighi (Modificado de Gonçalves, 1985).

*TABELA I – Identificação dos 15 triatomíneos utilizados nos experimentos*

<b>TÉCNICAS</b>	<b>Jejum alimentar</b>	<b>Estádio de desenvolvimento</b>	<b>Sexo</b>	<b>Número de animais</b>
<b>01</b> <b>(MO – Estrutura, morfometria e histoquímica)</b>	03 dias	Adultos	02 M 02 F	04
	20 dias	Adultos	02 M 01 F	03
<b>Subtotal</b>				<b>07</b>
<b>02</b> <b>(ME – análise da ultraestrutura)</b>	07 dias	Adultos	01 F 01 M	02
	25 dias	Adultos	03F 03M	06
<b>Subtotal</b>				<b>08</b>
<b>TOTAL GERAL DE ANIMAIS</b>				<b>15</b>

## *2.2. Histologia:*

Para o estudo histológico, as regiões do intestino médio foram transferidas para solução fixadora de Zamboni (Steffanini et al., 1967) por 24 horas, desidratadas em série crescente de etanol e incluídas em glicolmetacrilato (Historesin-Leica). Secções com 3 µm de espessura foram coradas pelo azul de toluidina-borax a 1% ou tricrômico de Cazon.

Algumas secções foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: PAS para evidenciar polissacarídeos e glicoconjugados neutros e mercúrio de bromofenol para identificação de proteínas totais e sulfato do azul de Nilo para identificação de lipídeos (Pearse, 1972).

## *2.3. Morfometria:*

Para a morfometria foram analisadas 10 secções histológicas por animal e em cada secção foram avaliadas 10 células digestivas do epitélio intestinal, totalizando cem células por animal. A altura e área da célula, área do núcleo e a relação núcleo/citoplasma foram determinadas com auxílio do Programa Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste t-Student com significância de 5%.

## *2.4. Ultra-estrutura:*

Para as análises ultra-estruturais, fragmentos das três regiões do intestino médio foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 2 horas. Depois de lavadas em tampão, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, por 2 horas. Após nova lavagem em tampão, o material foi contrastado em

acetato de uranila aquosa a 2% por 24 horas, desidratado em série crescente de acetona e embebido em resina Spurr. Secções ultra-finas foram contrastadas com acetato de uranila a 2% e com citrato de chumbo (Reynolds, 1963), examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Anatomia e Histologia:

O intestino médio de *T. vitticeps* divide-se anatomicamente em três regiões: anterior, mediana e posterior (Figura 2). A região anterior apresenta-se como um saco dilatado, com parede fina e muito dobrado. Suas dobras voltadas para o lúmen podem se expandir ou não conforme o volume de sangue estocado. A região mediana é um tubo longo e fino relativamente enovelado, cuja extremidade posterior apresenta uma pequena dilatação que antecede o início do proctodeu, caracterizando a região posterior do intestino médio. O limite entre o intestino médio e o proctodeu é identificado pela inserção de quatro túbulos de Malpighi.

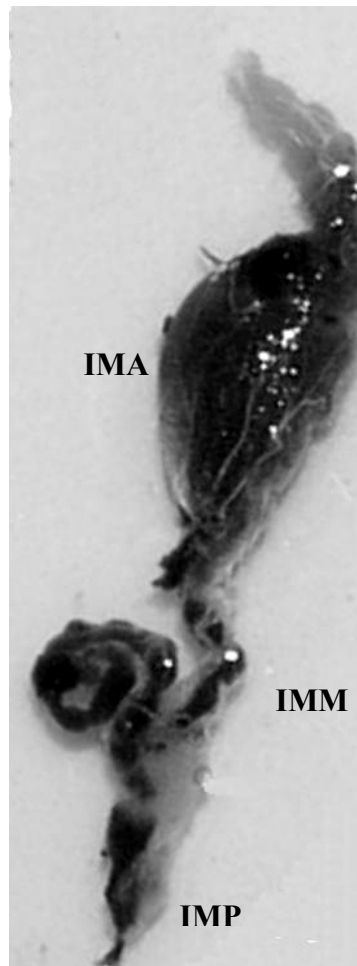


Figura 2 - Intestino Médio de *Triatoma vitticeps*

IMA – Intestino médio anterior, IMM – Intestino Médio Médio e IMP – Intestino Médio Posterior

O intestino médio é revestido por epitélio simples (figura 3A) cuja histologia permite a distinção de dois tipos celulares: (i) células digestivas que se caracterizam por apresentarem borda estriada, presença de grânulos com colorações distintas no citoplasma e núcleo com cromatina em diferentes graus de condensação e (ii) células regenerativas dispostas isoladamente ou formando ninhos entre a base das células digestivas, que repousam sobre a membrana basal. Abaixo da membrana basal estão presentes uma camada muscular circular interna e uma longitudinal externa (figura 3A).

As três regiões do intestino médio se diferenciam ao microscópio de luz, independente do período após repasto sanguíneo, pelo aspecto das dobras apicais do epitélio e pela espessura da camada muscular. Assim, as regiões anterior e posterior do intestino médio apresentam o epitélio muito pregueado quando comparado com a região mediana (Figura 4). Além disso, a camada muscular é mais desenvolvida na região anterior em relação ao observado nas outras regiões do intestino médio de *T. vitticeps*.

Nos insetos analisados três dias após o repasto, a porção anterior do intestino médio mostra o epitélio com projeções em suas superfícies apical e dobras basais, cujas células digestivas contêm grânulos citoplasmáticos corados e não corados e núcleo com predomínio de cromatina descondensada (figura 4A).

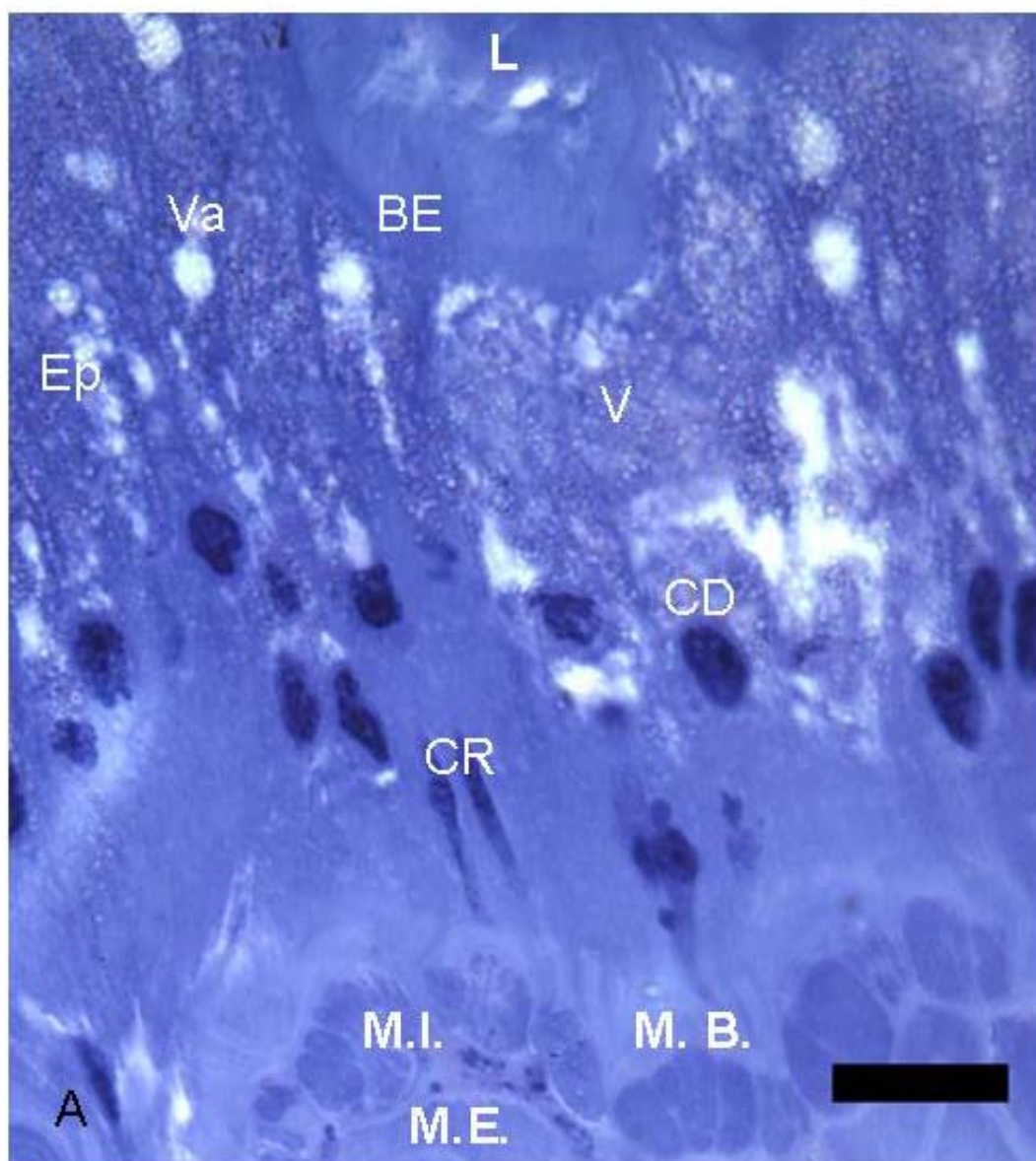
Vinte dias após a alimentação, vesículas com diferentes colorações e as dobras da superfície apical do epitélio são mais frequentes, quando comparada com o observado aos três dias de jejum (figura 4B).

As regiões mediana e posterior do intestino médio de *T. vitticeps* nos diferentes períodos de jejum alimentar, também apresentam epitélio dobras na região apical e vesículas citoplasmáticas com diferentes aspectos, os quais são mais evidentes e numerosos naqueles insetos 20 dias após a alimentação quando comparados com insetos com tempo menor de jejum alimentar (figuras 4C-F). A região posterior do intestino médio dos insetos três dias após repasto sanguíneo apresenta células digestivas com regiões intensamente basófilas.

### FIGURA 3

**Secções de intestino médio anterior de *Triatoma vitticeps* com 20 dias de privação alimentar.**

A - Epitélio (Ep) do intestino apresentando células digestivas (CD) com região apical dobrada e borda estriada (BE), citoplasma repleto de vesículas coradas (V) ou não (Va). Notar células regenerativas (CR) dispostas em ninhos ou isoladas na base do epitélio e camada muscular circular interna (MI) e a longitudinal externa (ME) abaixo da membrana basal (MB). Coloração por azul de toluidina. Barra: 10µm.



#### FIGURA 4

**Secções do Intestino médio de *Triatoma vitticeps* corado com azul de toluidina. Barra: 10µm.**

A – Intestino médio anterior de animal com três dias de jejum. V: vesículas; DA: dobras na superfície apical das células digestivas; n: núcleo de célula digestivas; M: camada muscular e L: Lúmem.

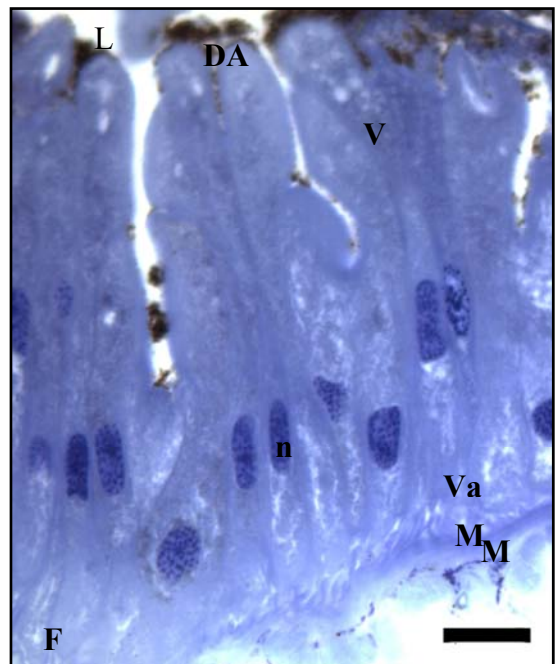
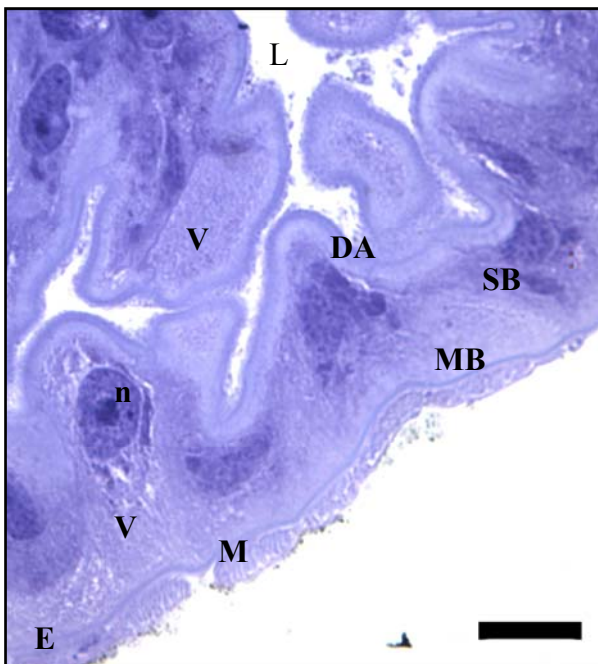
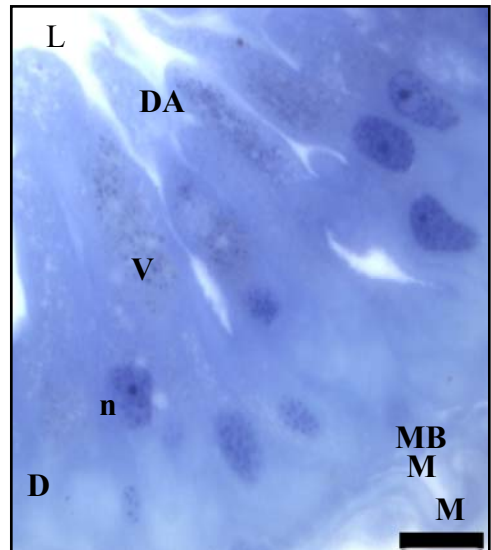
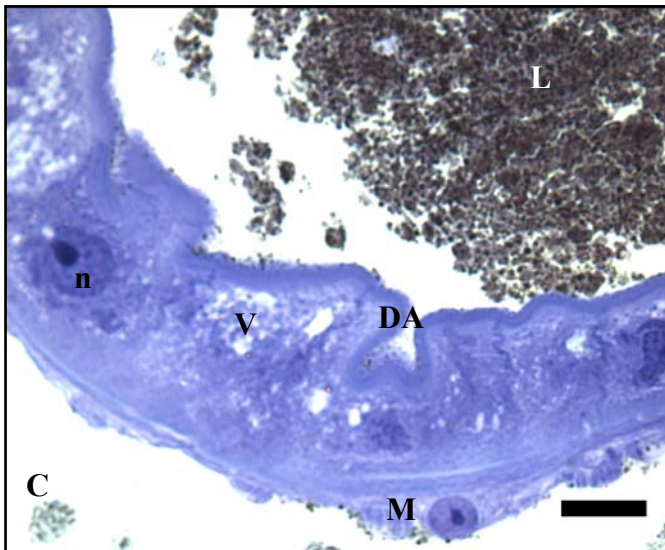
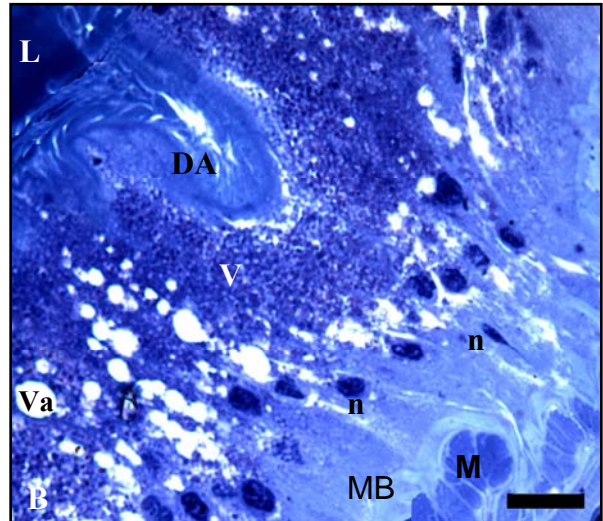
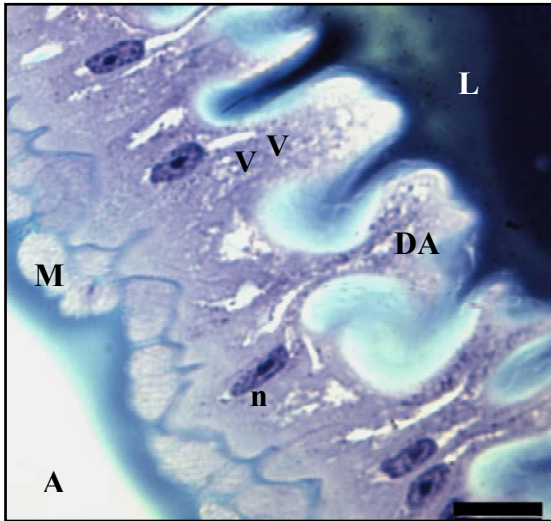
B - Intestino médio anterior com vinte dias de jejum. DA: dobras na membrana apical das células digestivas, Va: vesícula não corada, v: vesículas coradas; n: núcleos de células; MB: membrana basal; M.: musculatura e L: Lúmem.

C – Região média do intestino médio com três dias de jejum. M.: camada muscular; DA: dobras na superfície apical das células digestivas; V: vesículas com aspecto variado e L: Lúmem.

D - Intestino médio mediano com vinte dias de jejum. DA: dobras na superfície apical das células digestivas n: núcleo de célula digestiva; V: vesículas com aspecto variado; MB: membrana basal; M.: camada muscular e L: Lúmem.

E - Intestino médio posterior com três dias de jejum alimentar. DA: dobras na superfície apical das células digestivas; SB: Substância basófila; V: vesículas; MB: membrana basal; M: camada muscular; n: núcleo de células digestivas e L: Lúmem.

F: Intestino médio posterior com vinte dias de privação alimentar. DA: dobras na superfície apical das células digestivas; Va: vesículas não coradas; V: vesículas coradas; n: núcleo de célula digestiva; M: camada muscular e L: Lúmem.



### 3.2. Morfometria

Os dados morfométricos mostram que não há diferenças significativas na altura e área das células, na área dos núcleos e na relação núcleo/citoplasma das células digestivas do intestino médio de *T. vitticeps*, quando se comparam as diferentes regiões do intestino médio e os diferentes períodos de jejum alimentar (figuras 5-8).

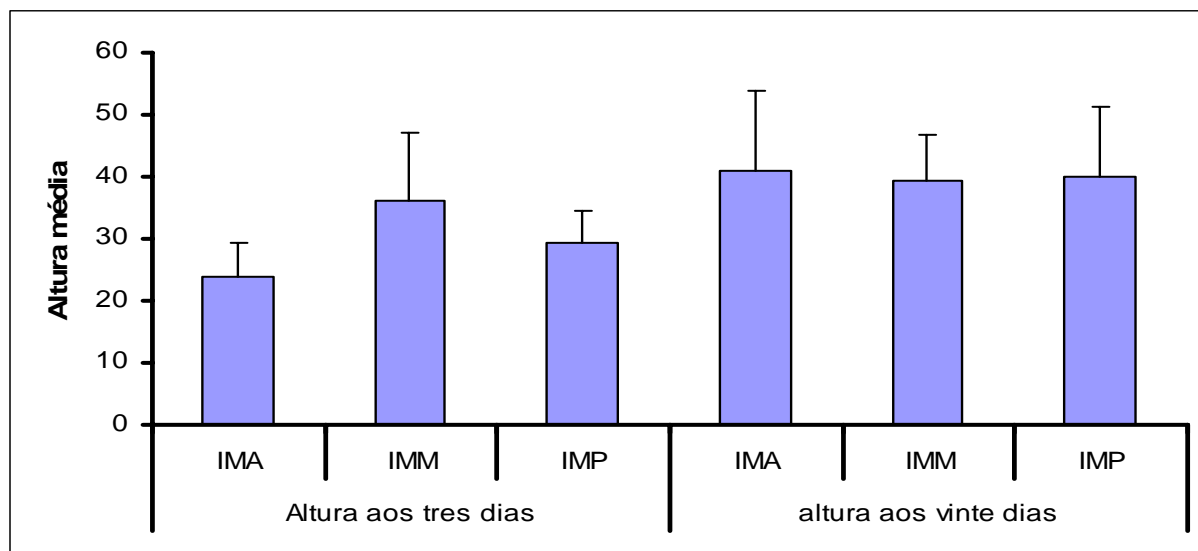


FIGURA 5 – Altura (média  $\pm$  dp) ( $\mu\text{m}$ ) das células digestivas nas diferentes regiões do intestino médio de *Triatoma vitticeps* em diferentes períodos de jejum alimentar ( $n=7$ ). IMA: intestino médio anterior, IMM: intestino médio médio, IMP: intestino médio posterior. Não há diferença significativa pelo test t-Student ( $P>0,05$ ).

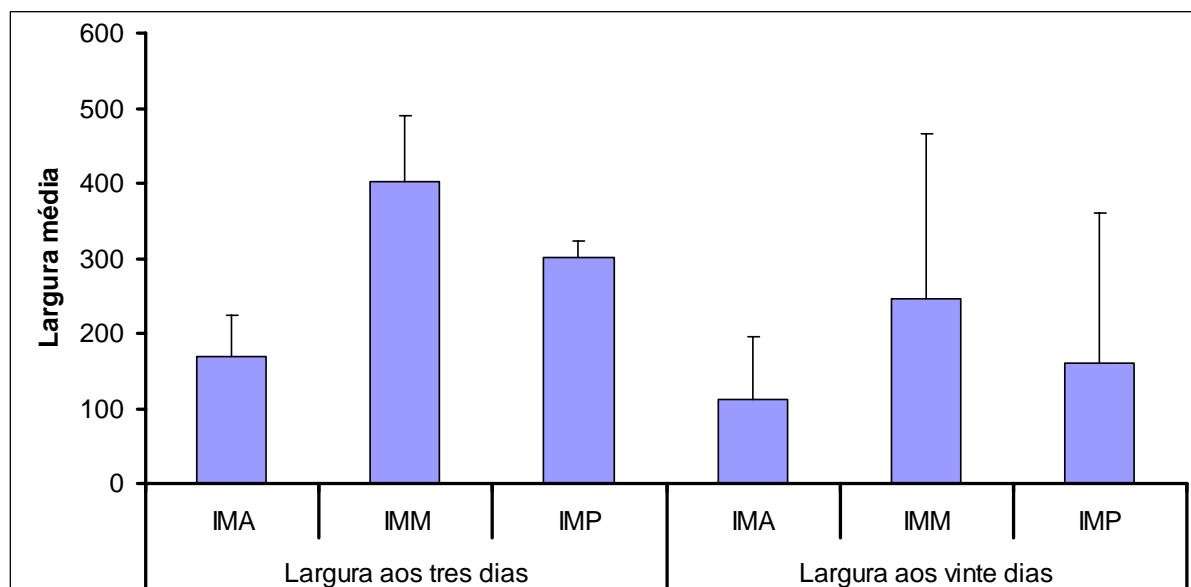


FIGURA 6 – Largura (média  $\pm$  dp) ( $\mu\text{m}$ ) das células digestivas nas diferentes regiões do intestino médio de *Triatoma vitticeps* em diferentes períodos de jejum alimentar ( $n=7$ ). IMA: intestino médio anterior, IMM: intestino médio médio, IMP: intestino médio posterior. Não há diferença significativa pelo test t-Student ( $P>0,05$ ).

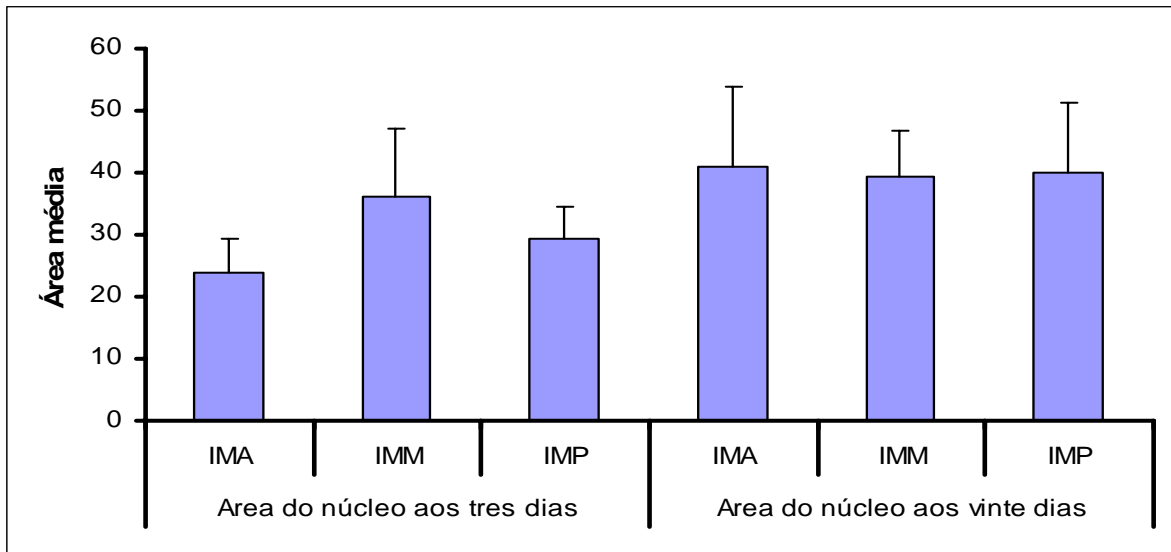


FIGURA 7 – Área do núcleo (média  $\pm$  dp) ( $\mu\text{m}$ ) das células digestivas nas diferentes regiões do intestino médio de *Triatoma vitticeps* em diferentes períodos de jejum alimentar ( $n= 7$ ). IMA: intestino médio anterior, IMM: intestino médio médio, IMP: intestino médio posterior. Não há diferença significativa pelo test t-Student ( $P>0,05$ ).

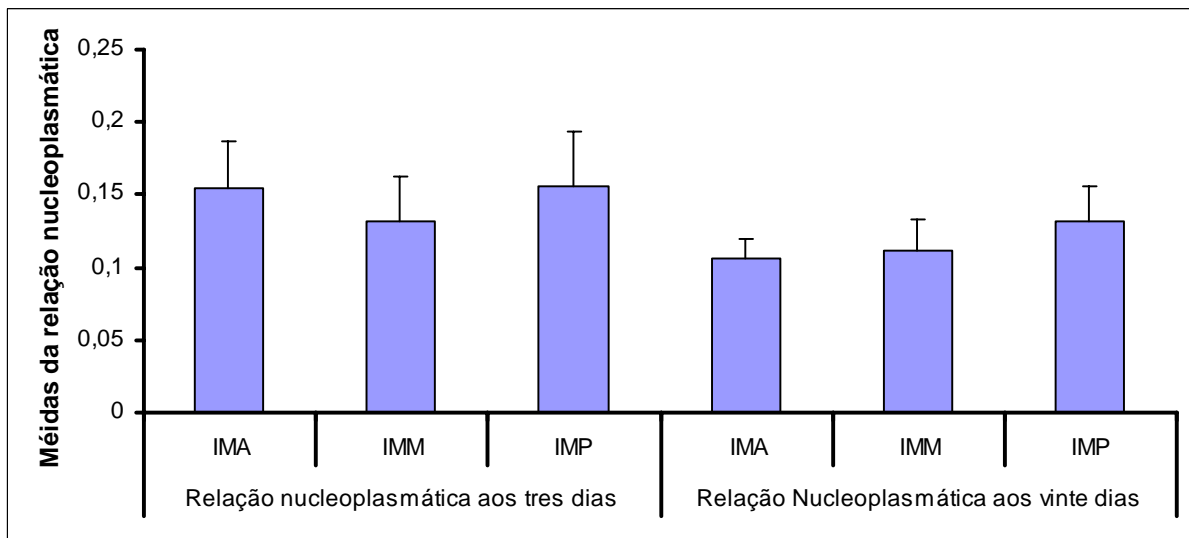


FIGURA 8 – Relação núcleo/citoplasma (média  $\pm$  dp) das células digestivas nas diferentes regiões do intestino médio de *Triatoma vitticeps* em diferentes períodos de jejum alimentar ( $n= 7$ ). IMA: intestino médio anterior, IMM: intestino médio médio, IMP: intestino médio posterior. Não há diferença significativa pelo test t-Student ( $P>0,05$ ).

### 3.3. Histoquímica:

A caracterização histoquímica das três regiões do intestino médio nos diferentes períodos de privação alimentar indica que glicoconjugados neutros ocorrem principalmente no ápice do epitélio, na membrana basal e em grânulos citoplasmáticos das células digestivas independentemente do período de jejum alimentar (Tabela 2, Figura 9). No entanto, três dias após a alimentação, há aumento de regiões PAS-positivas no ápice e base do epitélio e na membrana basal das regiões anterior e mediana do intestino médio e grânulos citoplasmáticos nas células digestivas na região anterior (Tabela 2, Figuras 9A, 9C, 9E). Em insetos 20 dias após o repasto, nas três regiões do intestino médio o ápice do epitélio permanece PAS positivo assim como os grânulos citoplasmáticos que parecem aumentar em quantidade (Figuras 9B, 9D, 9F).

Os testes com mercúrio de bromofenol indicaram que três dias após repasto o ápice do epitélio das regiões anterior e mediana do intestino médio apresenta reação positiva para proteínas, sendo observados raros grânulos citoplasmáticos positivos para proteínas (Tabela 2, Figuras 10A e 10C). Em *T. vitticeps* 20 dias após a alimentação, ao longo de todo o intestino médio, o ápice do epitélio, os grânulos citoplasmáticos e a membrana basal apresentam mais proteínas que naqueles insetos com três dias de jejum (Tabela 2, Figuras 10B, 10D e 10E).

Em relação ao teste para lipídeos há intensa reação positiva no ápice e base do epitélio, bem como nos grânulos citoplasmáticos das células digestivas na região anterior do intestino médio aos três dias de privação alimentar, enquanto que na região mediana do intestino médio o teste para lipídeos ocorre em menor intensidade (Tabela 2, Figuras 11A, 11D). Contudo, aos 20 dias de jejum, as reações nos grânulos citoplasmáticos das células digestivas, tornam-se mais evidentes tanto nas regiões anterior e mediana do intestino médio, ocorrendo presença de lipídeos neutros próxima ao ápice do epitélio e na membrana basal, além do aumento de lipídeos ácidos e neutros nos grânulos citoplasmáticos das células digestivas na região anterior do intestino médio (Tabela 2, Figuras 11B, 11C).

TABELA 2 – Sumário dos testes histoquímicos das três regiões do intestino médio de *Triatoma vitticeps* submetidos a diferentes períodos de jejum alimentar

Componente celular	Períodos de privação alimentar															
	3 dias							20 dias								
	IMA			IMM				IMP	IMA			IMM			IMP	
	PAS	BB	AN	PAS	BB	AN	PAS	PAS	BB	AN	PAS	BB	AN	PAS	BB	
Grânulos no citoplasma	++	nd	++	+	nd	+	+	+++	++	+++	++	+	++	±	+++	
Ápice do epitélio	+++	+++	++	+++	+	++	++	+++	++	±	+++	±	+++	±	±	
Membrana basal	+++	++	++	+++	+	±	+	++	++	±	+++	±	±	±	++	

PAS, polissacarídeos e proteínas conjugadas; BB, azul de bromofenol; AN, azul de Nilo. IMA – intestino médio anterior, IMM – intestino médio mediano, IMP – intestino médio posterior, PAS – ácido periódico Schiff. Parâmetros da intensidade de marcação histoquímica: +++, alta intensidade; ++, intensa; ±, médio; +, baixa intensidade; nd – não determinado

### Figura 9

**Secções histológicas do intestino médio de *Triatoma vitticeps* submetido ao teste de PAS. Barras: 10µm.**

A - Intestino médio anterior aos três dias de jejum alimentar.

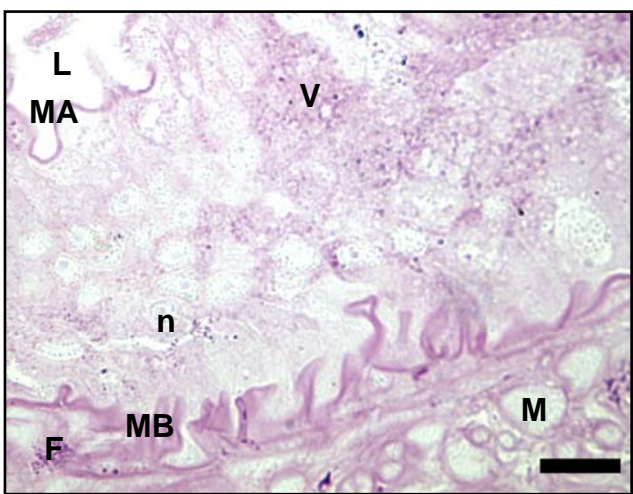
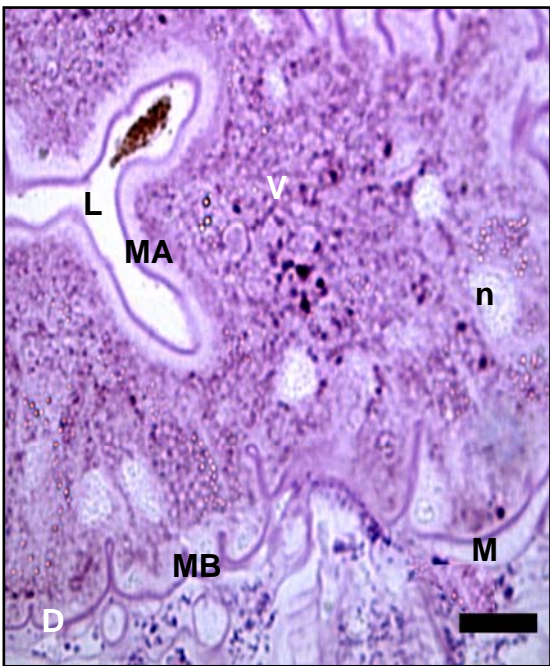
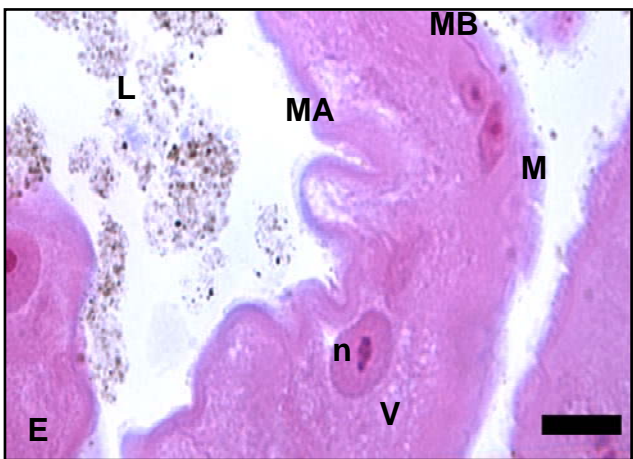
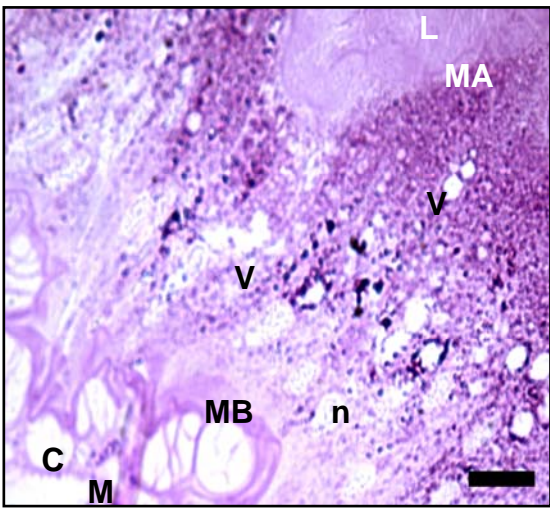
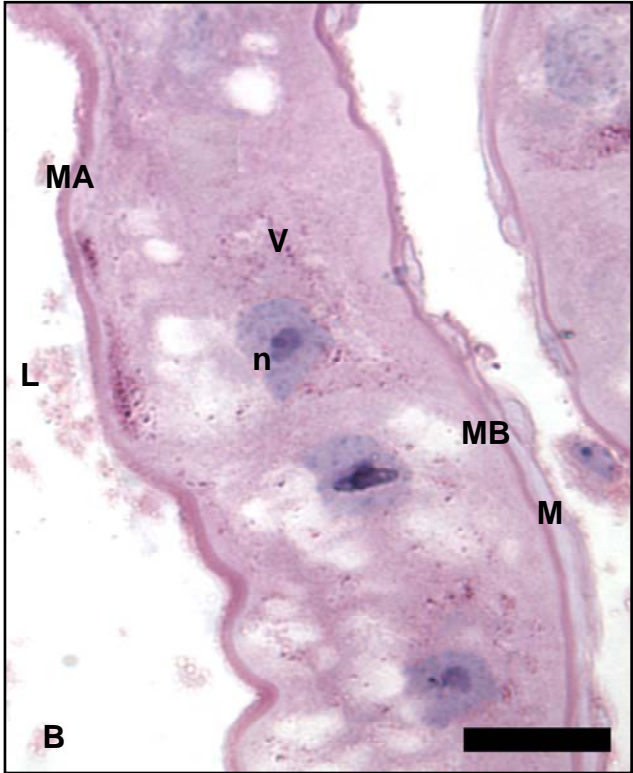
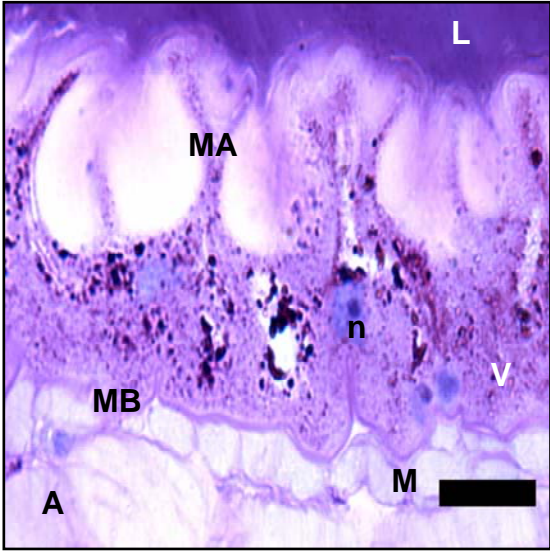
B - Intestino médio mediano aos três dias de privação alimentar.

C - Intestino médio posterior aos três dias de jejum.

D - Intestino médio anterior aos vinte dias de privação alimentar.

E - Intestino médio mediano aos vinte dias de privação alimentar.

F - Intestino médio posterior aos vinte dias de jejum alimentar. Em todas as figuras MA é membrana apical; MB: membrana basal; v: vesículas; n: núcleo de células digestivas, M: camada muscular e L: lúmem.



## FIGURA 10

**Secções histológicas do intestino médio de *Triatoma vitticeps* submetido ao teste de Mercúrio de Bromofenol. Barras: 10µm**

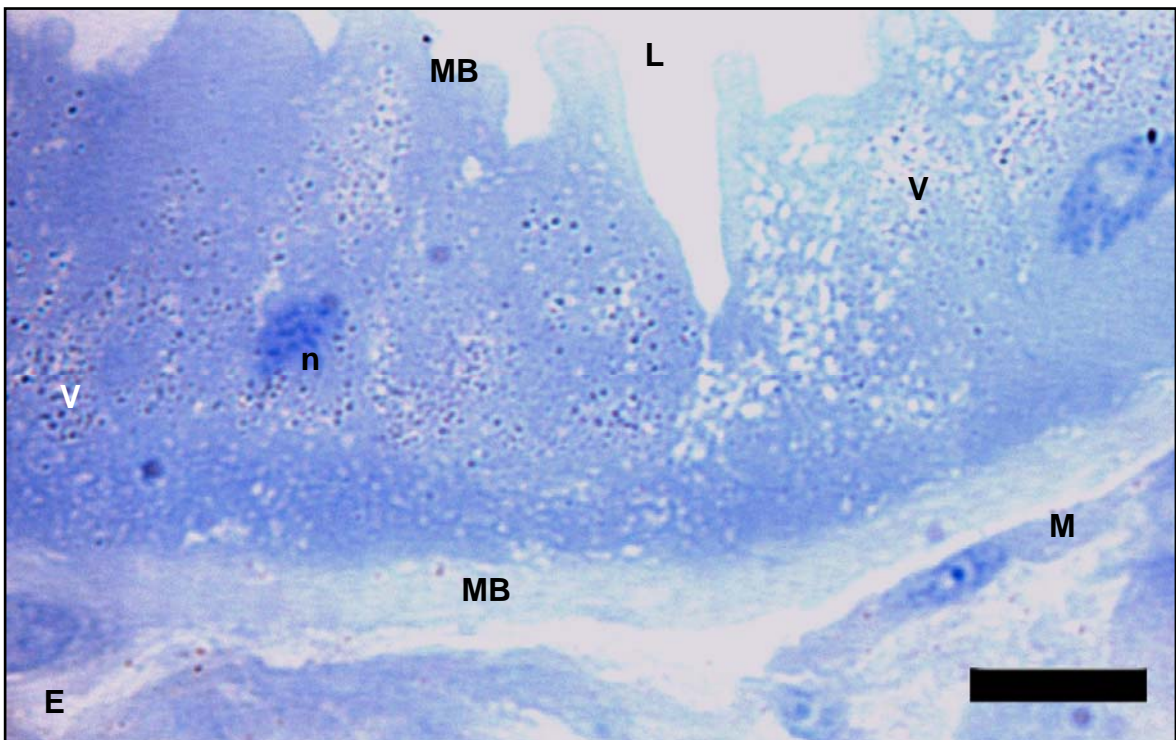
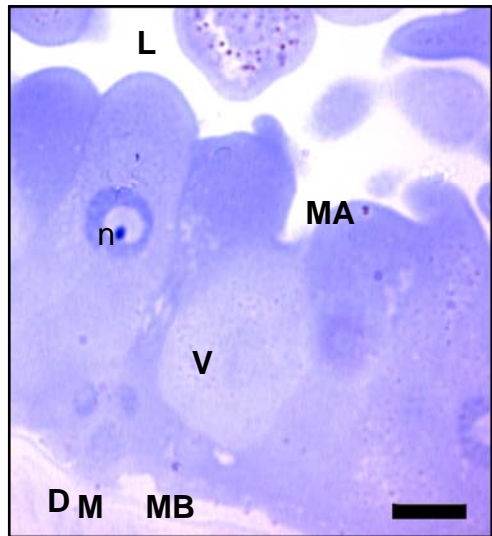
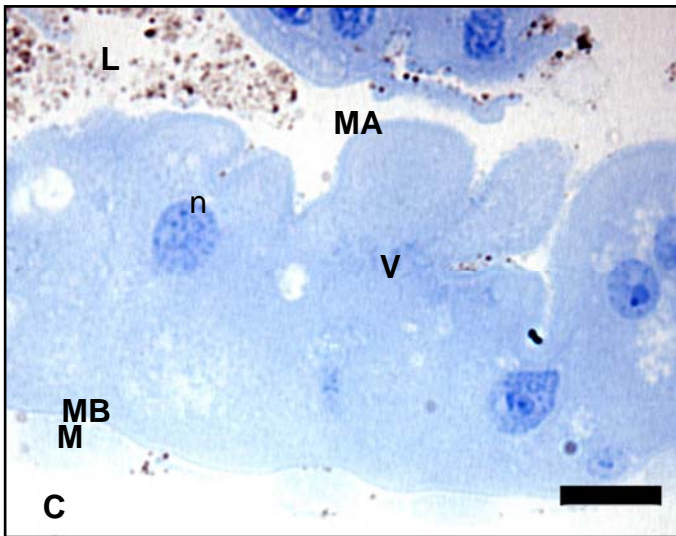
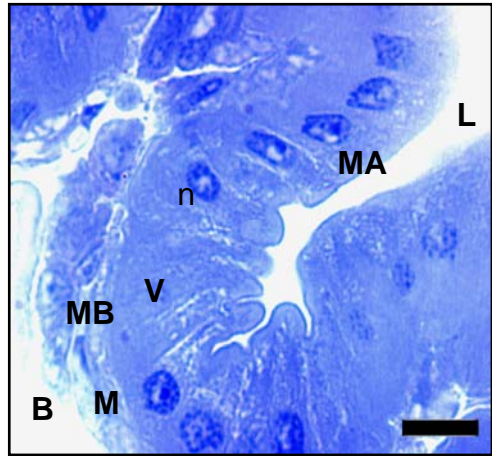
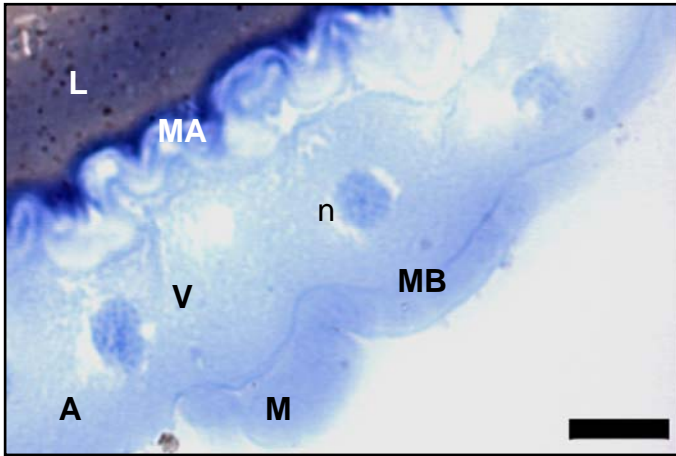
A- Intestino médio anterior aos três dias de jejum alimentar.

B- Intestino médio anterior aos vinte dias de privação alimentar.

C- Intestino médio mediano aos três dias de jejum.

D- Intestino médio mediano aos vinte dias de privação alimentar.

E- Intestino médio posterior aos vinte dias de jejum alimentar. Em todas as figuras MA é membrana apical; MB: Membrana basal; V: estruturas semelhantes a vesículas; n: núcleo de células digestivas, M: musculatura e L: lúmem.



## FIGURA 11

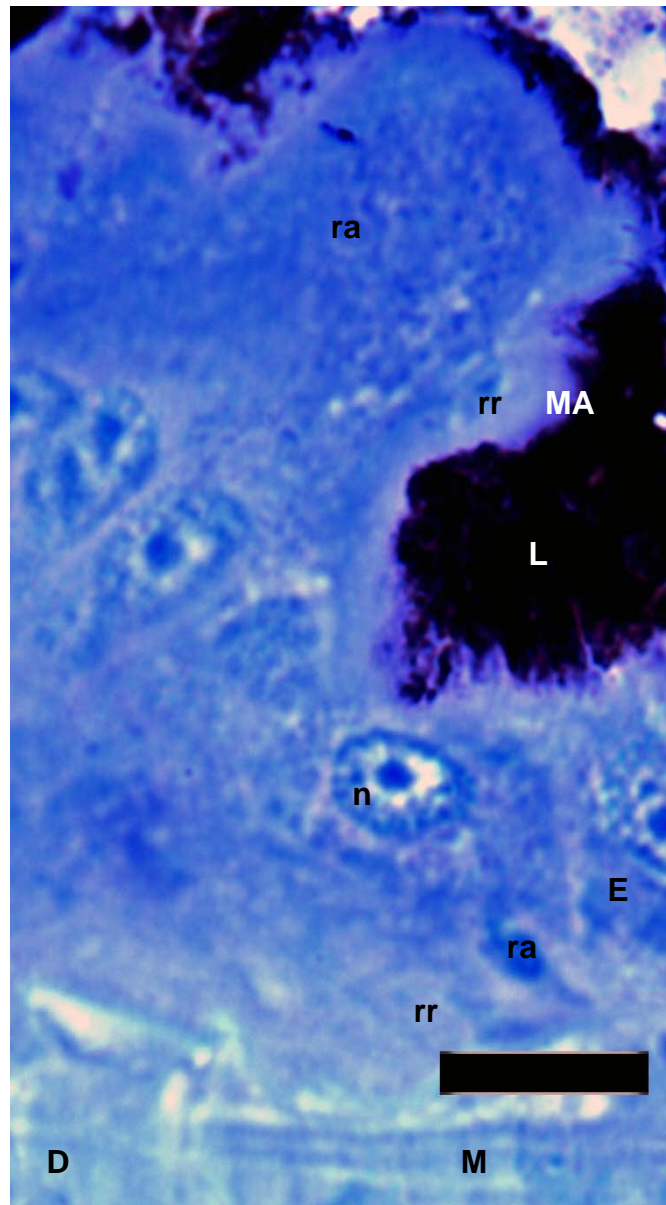
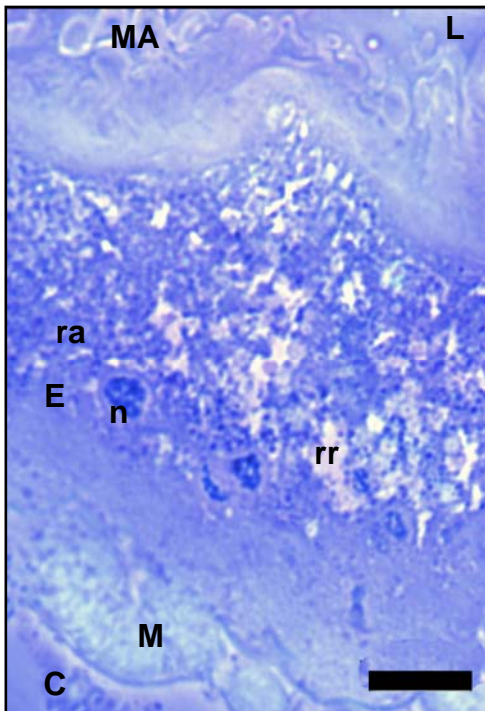
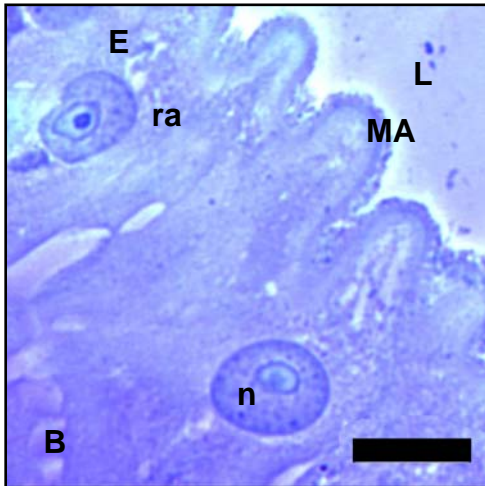
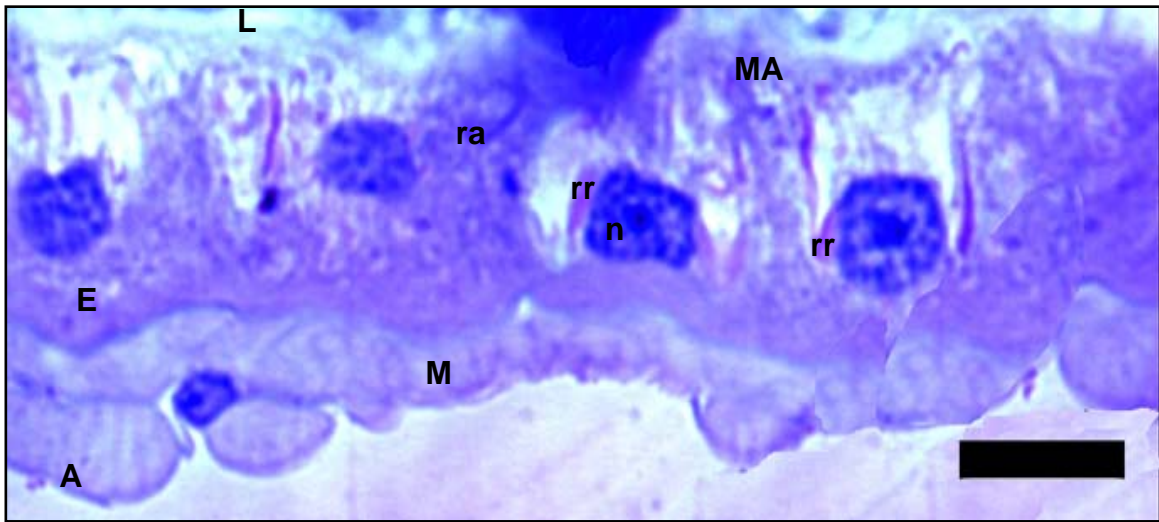
**Secções do intestino médio de *Triatoma vitticeps* submetido ao teste de azul do Nilo.  
Barras: 10µm.**

A - Intestino médio anterior aos três dias de jejum alimentar;

B - Intestino médio anterior aos vinte dias de privação alimentar;

C - Região mediana do intestino médio aos três dias de jejum.

D - Região mediana do intestino médio aos vinte dias de privação alimentar. Em todas as figuras MA é membrana apical; ra: regiões marcadas em azul (lipídeos neutros); rr: regiões coradas em rosa (lipídeos ácidos); E: epitélio, n: núcleo de célula colunar e M.: musculatura e L: Lúmem.



### 3.4. Ultra-estrutura

A análise da ultra-estrutura das diferentes regiões do intestino médio de *T. vitticeps* em diferentes estádios de desenvolvimento não apresentou mudanças em suas características morfológicas, que se apresentaram semelhantes em indivíduos do 2º e 5º instares e nos adultos.

A ultra-estrutura das diferentes regiões do intestino médio de *T. vitticeps*, mostra que as células digestivas apresentavam no ápice, microvilosidades sustentadas por material fibroso correlacionado ao citoesqueleto de actina, além disso, na face voltada para o lúmen estas estruturas são revestidas por uma membrana dupla correspondente a membrana perimicrovilar (Figuras 12A, 12B e 12C). Junções septadas estão presentes nas membranas plasmáticas laterais das células digestivas adjacentes (Figura 13B).

As membranas perimicrovillares (Figura 12B) formam um cilindro que envolve as microvilosidades, isolando-as do lúmen, e em alguns pontos do intestino médio, no animal com vinte e cinco dias de jejum, estão ausentes. O citoplasma apical das células digestivas da região posterior do intestino médio apresenta muitas mitocôndrias que se mostram pequenas e com muitas cristas (Figura 12C).

A membrana plasmática basal das células digestivas, ao longo de todo o intestino médio, apresenta dobras formando um labirinto basal bem desenvolvido associado a mitocôndrias (Figura 13A). Espaços extracelulares do labirinto basal são mais dilatados na região anterior do intestino médio em insetos com sete dias de jejum quando comparados aqueles de insetos com os demais períodos de jejum (Figura 13C).

As células digestivas nas três regiões do intestino médio apresentam núcleo com cromatina descondensada e algumas áreas de cromatina condensada distribuídas em grumos, sendo o citoplasma perinuclear rico em elementos do complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figuras 13A e 13B), além de vesículas com tamanho e elétron-densidades variadas (Figuras 14, 15 e 16).

Algumas características relacionadas, sobretudo ao tipo de granulação e de vesículas no citoplasma, permitiram diferenciar as células digestivas das três regiões do intestino médio de *T. vitticeps*. Desta maneira, na região anterior do intestino médio as células digestivas apresentam grânulos de glicogênio, lipídeos e esferocristais (Figura 14). Alguns esferocristais com aspecto de degradação por ação lisossômica foram observados nesta região do intestino

médio. Na região mediana do intestino médio as células digestivas apresentam acúmulos de grânulos e vesículas com diferentes graus de elétron-densidade (Figura 15). Grânulos elétron-densos, vesículas elétron-lúcidas e elétron-densas foram observadas sendo secretadas para o lúmen do intestino médio. Na região posterior do intestino médio, as células digestivas apresentam vesículas com aspectos diversos, podendo estar dispersas pelo citoplasma como também sendo secretadas por entre as microvilosidades (Figura 16), além de gotas lipídicas e grânulos de hemozoína que são caracterizados por forte densidade aos elétrons. Células com características de degeneração com nítida desorganização das microvilosidades e processo de vacuolização citoplasmática foram encontradas nesta região do intestino médio de insetos 25 dias após o repasto sanguíneo.

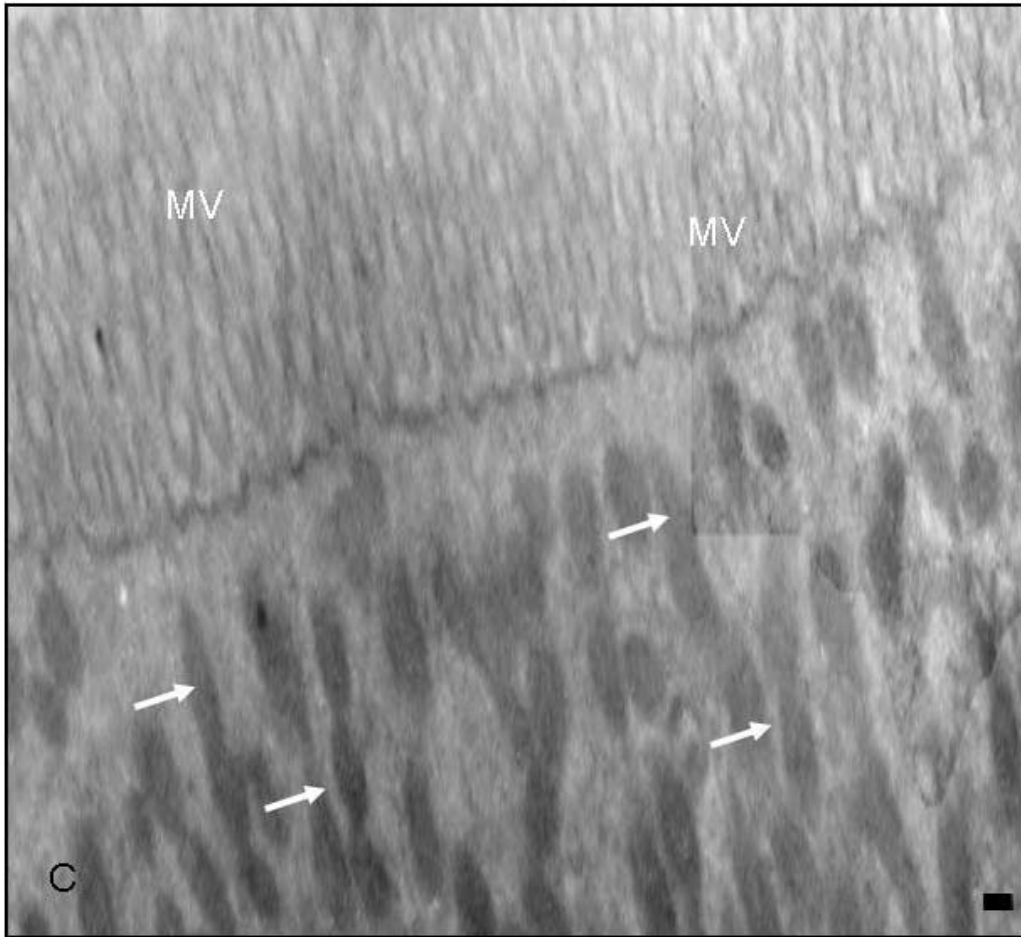
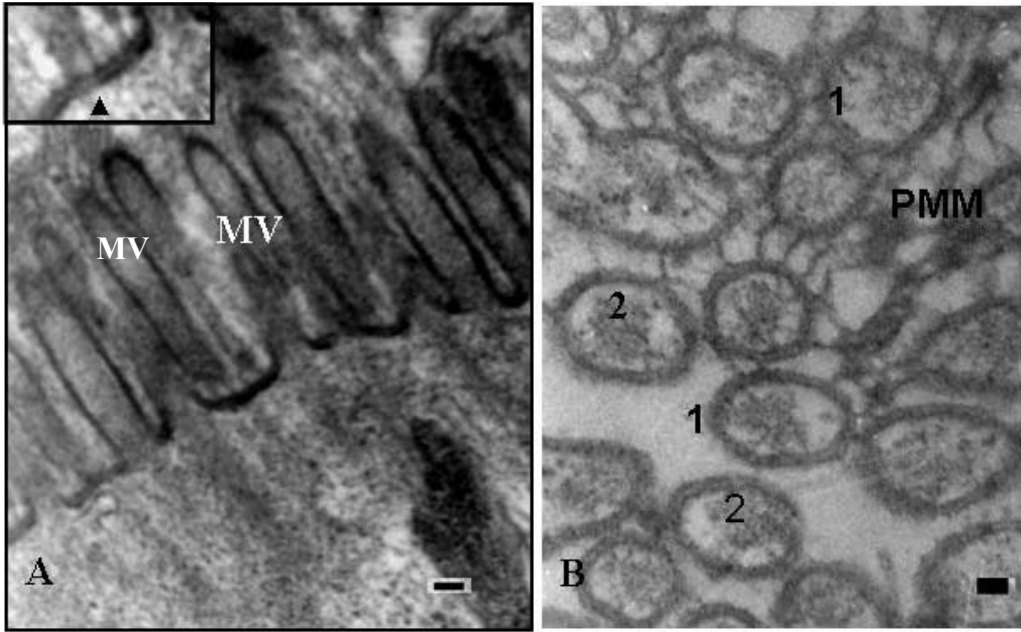
## FIGURA 12

**Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio do intestino médio de *Triatoma vitticeps* com 25 dias de privação alimentar. Barras: 1  $\mu\text{m}$**

A – Região apical da célula absorptiva do intestino anterior mostrando microvilosidades (MV). Em detalhe, microvilosidades revestidas por membrana dupla (cabeça de seta) no epitélio de inseto adulto.

B - Epitélio intestinal mostrando microvilosidades sustentadas internamente por estruturas filamentosas (2) sendo revestidas externamente por membrana perimicrovilar (PMM). Algumas áreas apresentam-se desprovidas de membrana perimicrovilar (1).

C - Região apical de célula digestiva do epitélio do intestino médio posterior indicando a presença de mitocôndrias (seta) localizadas na base das microvilosidades em maior número do que o verificado nas outras regiões do intestino.



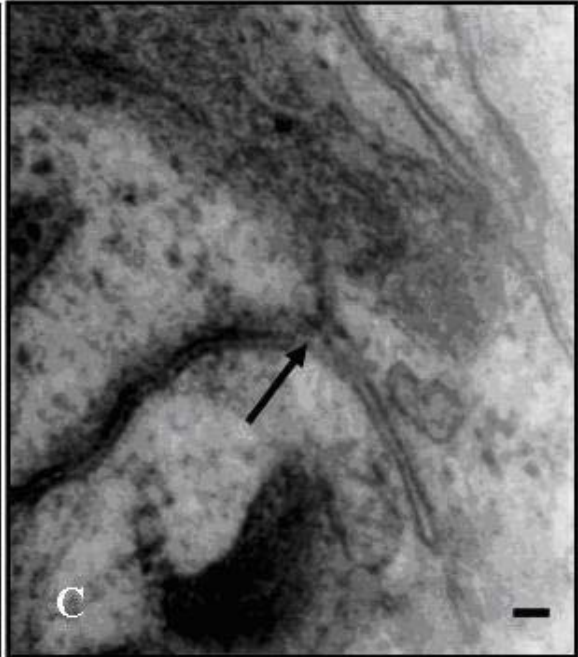
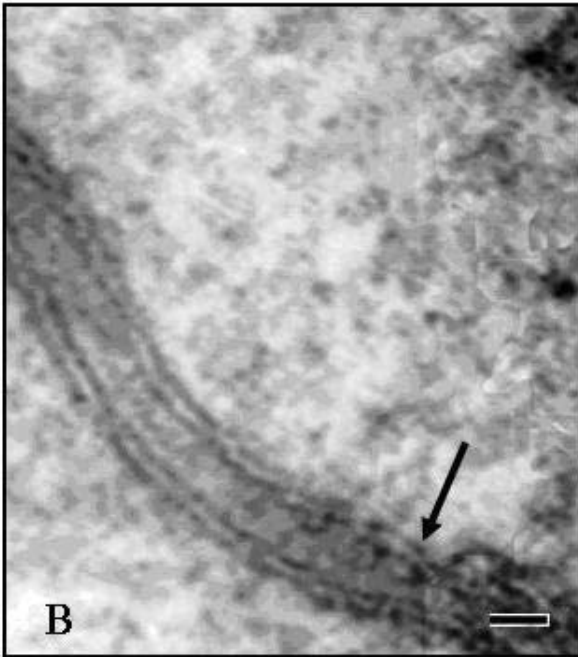
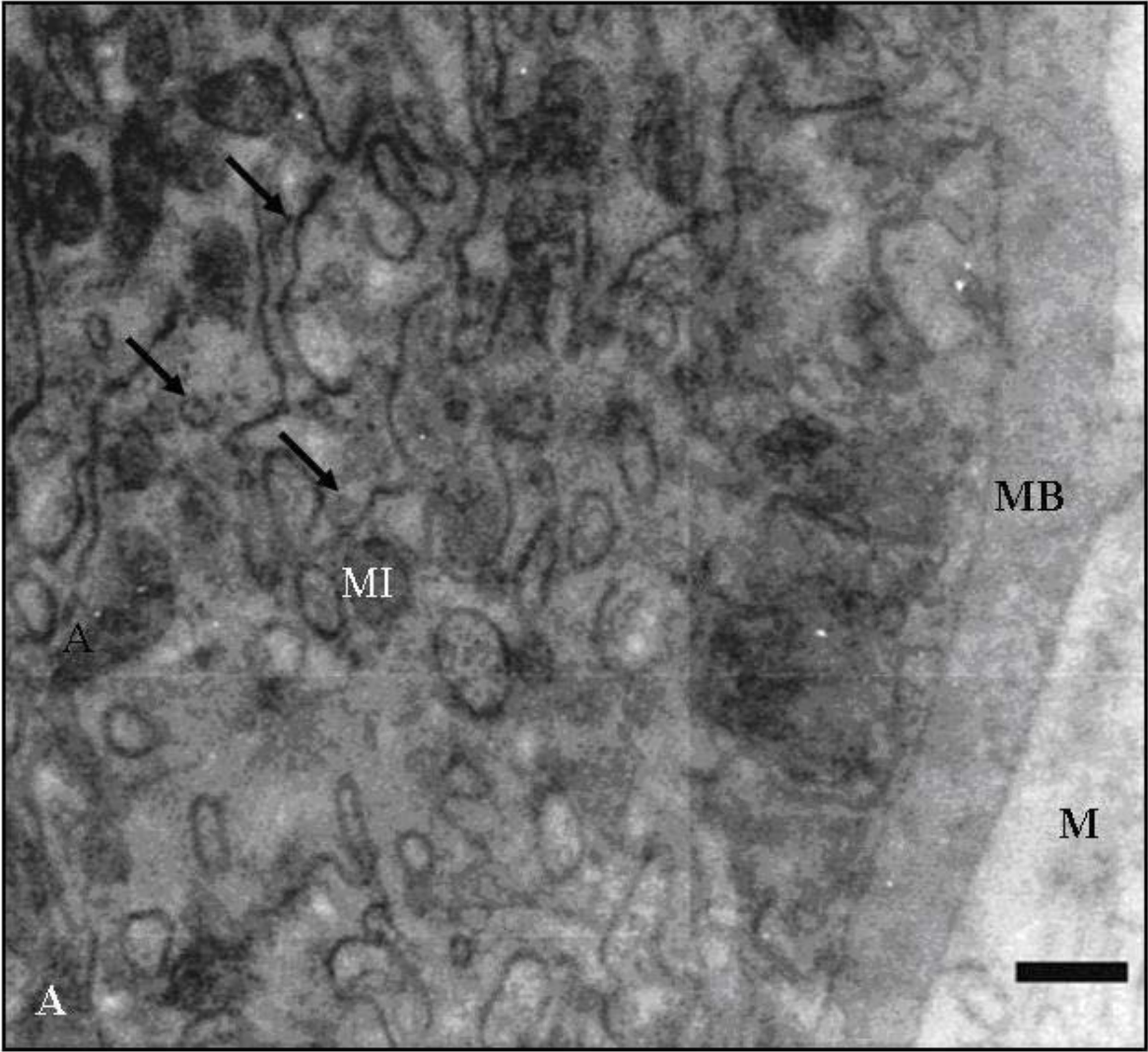
### FIGURA 13

**Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio do intestino médio de *Triatoma vitticeps* com 25 dias de privação alimentar.**

A – As células do epitélio intestinal repousam sobre membrana basal (MB). Abaixo da membrana basal observa-se camada muscular (M). Região basal é intensamente preenchida por dobras basais (seta) associadas a mitocôndrias (MI). Barra: 4  $\mu\text{m}$ .

B – No intestino médio anterior registrou-se presença de junções septadas (seta) entre as membranas laterais de células vizinhas. Barra: 6 nm

C – Detalhe da membrana basal que se invagina e forma o labirinto basal no intestino médio anterior, cujas membranas apresentam-se muito unidas não permitindo observar espaços extra-celulares. Barra: 20 nm



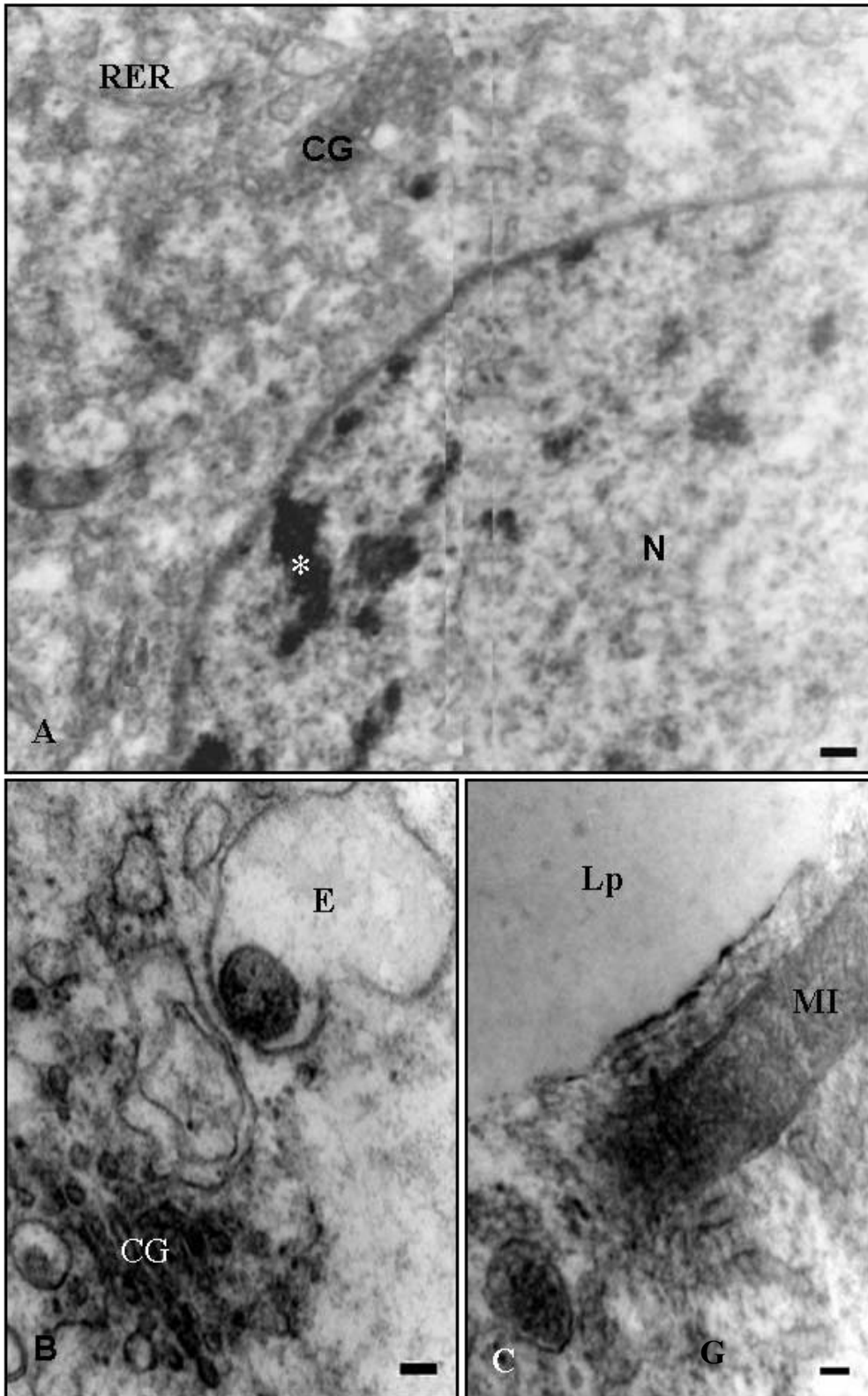
## FIGURA 14

**Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio do intestino médio anterior de *Triatoma vitticeps* com 25 dias de privação alimentar.**

A - Região anterior do intestino médio (IMA), mostrando núcleo (N) com cromatina frouxa e algumas áreas de cromatina condensada formando grumos (\*), no citosol se observa complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático rugoso (RER). Barra: 2 $\mu$ m.

B - Detalhe do Complexo de Golgi (CG), mostrando esferocristais em vesículas com nítida degradação lisossomal (E). Barra: 1 $\mu$ m.

C - Detalhe da mitocôndria (MI), associado a vesículas armazenadoras de lipídio (Lp), além da presença de grãos de glicogênio (G). Barra: 0,01 $\mu$ m

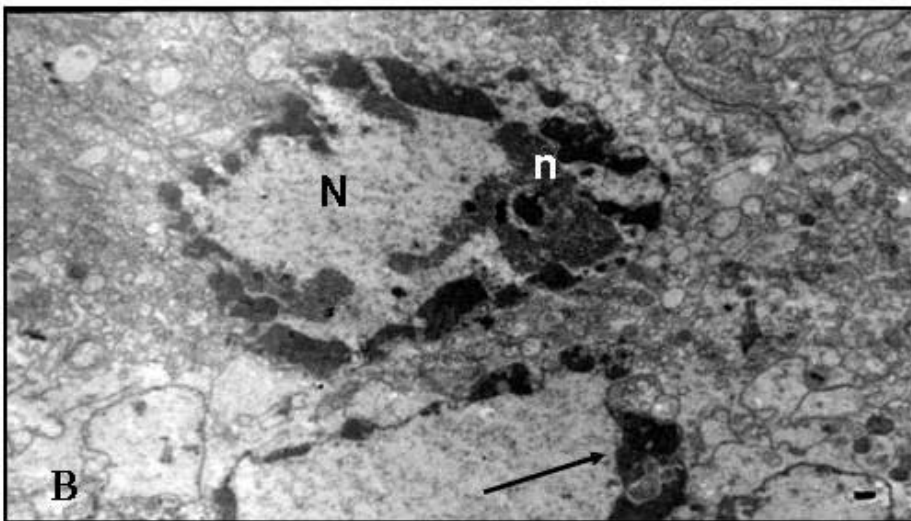
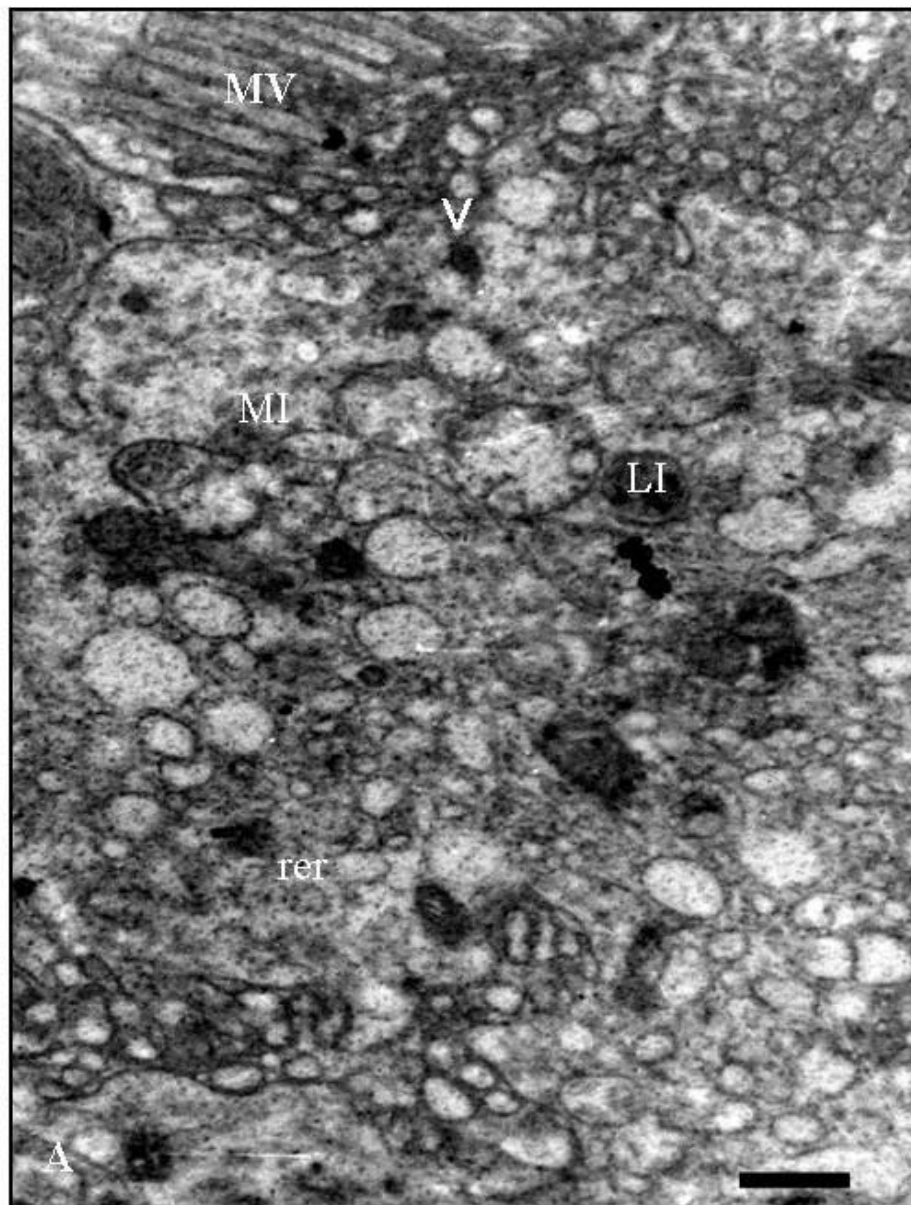


## FIGURA 15

**Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio da região mediana do intestino médio de *Triatoma vitticeps* com 7 dias de privação alimentar.**

A – Região apical de célula digestiva mostrando a presença de microvilosidades (MV), além de algumas organelas tais como as mitocôndrias (MI), abundante retículo endoplasmático rugoso (rer) e lisossomos (Li). Apresentam também vesículas (V) distribuídas no citosol e associadas aos microvilos (MV). Barra: 5  $\mu$ m.

B – Núcleo (N) e nucléolo (n) de célula digestiva com cromatina pouco condensada e em algumas regiões apresentam-se formando grumos (seta). Barra: 2  $\mu$ m.



## FIGURA 16

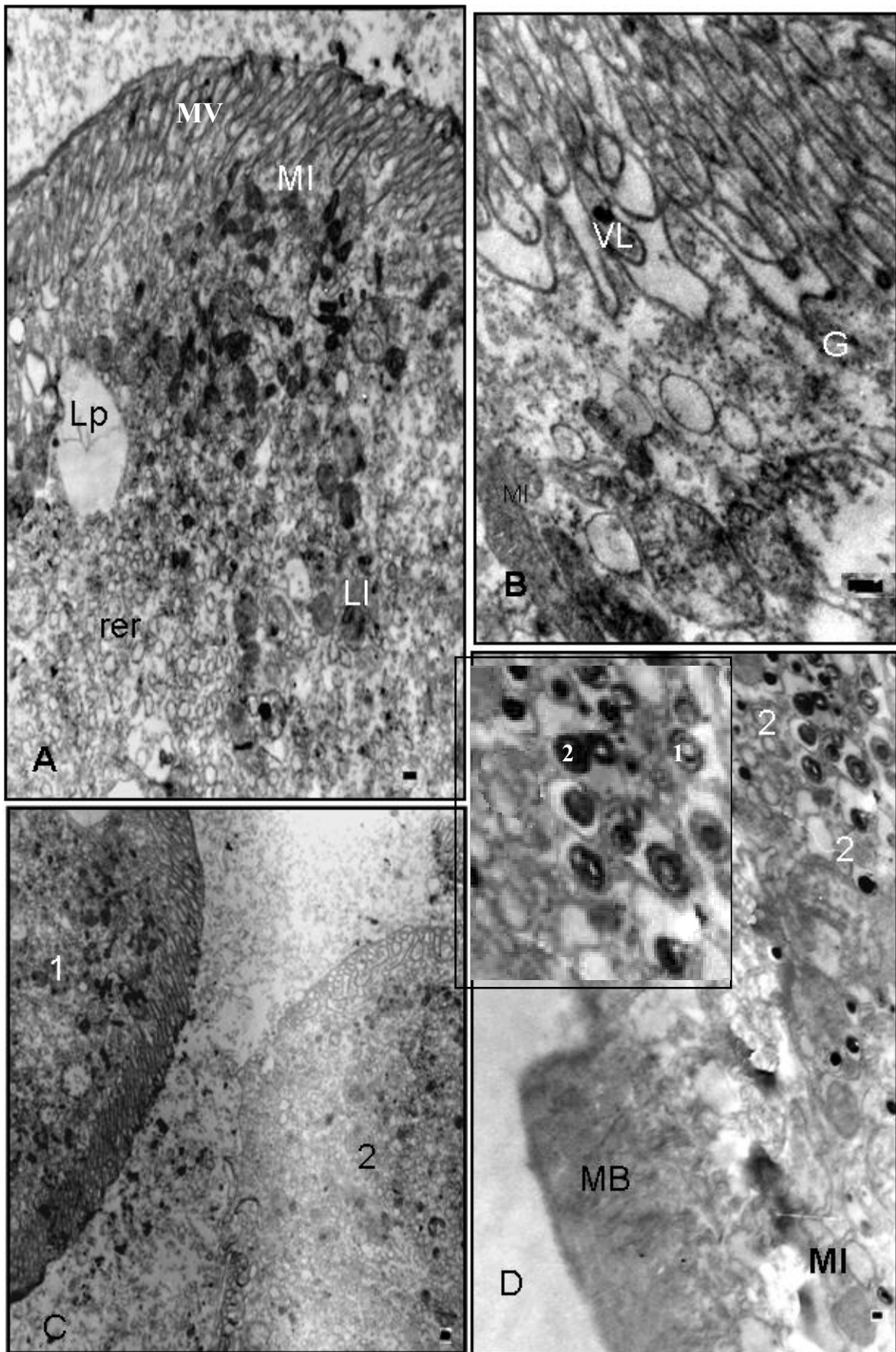
**Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio do intestino médio posterior de *Triatoma vitticeps* com 25 dias de privação alimentar.**

A – Citoplasma apical de célula digestiva, apresentando mitocôndrias (MI), lisossomos (Li), vesículas de lipídios (Lp) e no ápice da célula se observa microvilosidades (MV). Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

B – Região apical da célula digestiva mostrando microvilosidades (MV), logo abaixo encontra-se vesículas elétron-lúcidas (VL), mitocôndrias (MI) e grânulos de glicogênio (G). Barra: 4  $\mu\text{m}$ .

C – Ápices de células digestivas (1) mostrando à direita uma célula em processo de degeneração (2). Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

D – Região basal da célula digestiva mostrando a membrana basal (MB) e mitocôndria (MI), No inserto detalhes dos esferocristais (1) e Hemozoína (2). Barra: 5  $\mu\text{m}$ .



#### 4. DISCUSSÃO

O intestino médio de *T. vitticeps* apresenta parede formada por epitélio simples colunar que repousa sobre uma membrana basal seguida de fibras musculares circulares internas e longitudinais externas. O epitélio é constituído por dois tipos básicos de células, as digestivas e as regenerativas. Apesar de se aceitar que células endócrinas também podem ser encontradas no epitélio do intestino médio, sua identificação segura só foi possível com técnicas de imunocitoquímicas (ver capítulo 2). Essas características estruturais indicam que o intestino médio deste hemíptero é semelhante ao de outros insetos, conforme descrito por Cruz-Landim (1985). A espécie aqui estudada, assim como outros hemípteros hematófagos, como *R. prolixus* (Billingsley & Downe, 1983) e *T. infestans* (Burgos & Gutierrez, 1976) apresentam membrana perimicrovilar revestindo a porção apical das microvilosidades presentes nas células digestivas, que é uma estrutura comumente encontrada nos hemípteros (Terra *et al.*, 2006).

A relação núcleo/citoplasma observada no epitélio de *T. vitticeps* nos diferentes períodos de jejum indica que a privação alimentar não altera este parâmetro e que as células permanecem ativas durante todo o ciclo alimentar, corroborando os dados de Billingsley & Downe (1986b).

Os resultados histológicos, histoquímicos e ultraestruturais mostram aspectos da morfologia e da fisiologia das células digestivas nas diferentes regiões do intestino médio, que se modificam de acordo com o período de privação alimentar. A presença de vesículas de diferentes tamanhos e colorações no citoplasma das células digestivas indicam que estes tipos celulares podem estar envolvidos com funções de secreção e de absorção de substâncias. Neste sentido, vesículas menores e elétron-densas estão associadas com funções secretoras enquanto que as vesículas maiores e elétron-lúcidas estão associadas com a função de absorção (Billingsley & Lehane, 1996; Lehane, 1997). No intestino médio do hemíptero fitófago *Lygus hesperus* as células digestivas também podem ser distinguidas pelo tamanho e elétron-densidade de vesículas em seu citoplasma (Habibi *et al.*, 2008).

A presença de grânulos de lipídeos e glicogênio no citoplasma das células digestivas sugere que a região anterior do intestino médio de *T. vitticeps* atua no metabolismo de lipídeos e açúcares. Além disso, a ocorrência do labirinto basal mais desenvolvido nas células digestivas dessa região e a presença de esferocristais indicam seu papel no transporte e

armazenamento de íons e água. Estas funções para a região anterior do intestino médio são confirmadas por trabalhos envolvendo outros hemípteros, tanto os hematófagos (Farmer *et al.*, 1981; Barrett, 1982; Azambuja *et al.*, 1983; Ribeiro *et al.*, 1984; Billingsley, 1990), como aqueles que apresentam hábitos alimentares diferentes como o onívoro aquático *Cenocorixa bifida* (Jarial, 2005) e o predador *Brontocoris tabidus* (Guedes *et al.*, 2007, Fialho *et al.*, 2009).

As trocas de eletrólitos entre as células e o meio extracelular são realizadas por proteínas que funcionam como bombas e transportadores, localizados na membrana das microvilosidades e nos domínios basolaterais de células digestivas (Terra *et al.*, 2006). Terra & Ferreira, (1994; 2006) descrevem o fluxo contracorrente de fluídos no intestino médio, pela saída destes na região posterior e sua absorção na região anterior. A maior concentração destas proteínas nessa região poderia explicar a maior positividade ao azul de bromofenol nas porções apicais e basais da região anterior do intestino médio de *T. vitticeps*.

Embora a presença de lipídeos no citoplasma das células do intestino médio através da técnica do azul de Nilo, tenha apresentado algumas regiões sem marcação (possivelmente causado pelo uso do álcool no processamento do material), foi possível identificar maior ocorrência de grânulos de lipídeos aos 20 dias de privação alimentar na região anterior do intestino médio de *T. vitticeps*. A presença destes grânulos também foi confirmada pela análise ultra-estrutural, o que reforça o papel desta região como órgão de estocagem e processamento de lipídeos, similarmente ao encontrado em *R. prolixus* (Billingsley & Downe, 1986a).

A função de secreção de substâncias, digestão e absorção por parte da região mediana do intestino médio de *T. vitticeps* foi evidenciada pelo estado descondensado da cromatina, presença de RER, complexo de Golgi, lisossomos e a riqueza em vesículas e inclusões no citoplasma das células digestivas. A região mediana do intestino médio de hemípteros é o principal centro de digestão de substâncias, principalmente proteínas, além da ocorrência de absorção de nutrientes (Wigglesworth, 1975; Houseman & Downe, 1983; Billingsley & Downe, 1983; Billingsley & Downe, 1988; Billingsley, 1990; Chapmann, 1998; Nation, 2002; Borges *et al.*, 2006, Guedes *et al.*, 2007; Fialho *et al.*, 2009).

Na região posterior do intestino médio as células digestivas apresentam a membrana plasmática com muitas projeções em sua região apical e citoplasma com grânulos de hemozoína, vesículas com conteúdo protéico e gotas lipídicas, indicando as possibilidades de

atuação tanto na absorção, como na digestão e armazenamento de substâncias, similarmente ao observado em *R. prolixus* (Billingsley & Downe, 1985; 1986a e b; 1988)

Os resultados aqui obtidos sugerem função mais expressiva de transporte de íons pela região anterior e de digestão e/ou absorção de nutrientes pelas regiões mediana e posterior do intestino médio de *T. vitticeps*, similarmente ao reportado para outros insetos (Hecker *et al.*, 1971, 1974; Hecker, 1977; Rudin & Hecker, 1979; Billingsley & Downe; 1988, Guedes *et al.*, 2007, Azevedo, no prelo, Fialho *et al.*, 2009).

O maior número e tipos de grânulos citoplasmáticos aos 20 dias de privação alimentar nas células digestivas em todas as regiões do intestino médio de *T. vitticeps*, apontam para a relação entre os aspectos morfológicos e fisiológicos desse tipo celular e o tempo após repasto sanguíneo. Vários trabalhos desenvolvidos com insetos sugadores de sangue têm comprovado essa relação (Billingsley, 1988; Ribeiro & Pereira, 1984; Andrade-Coêlho *et al.*, 2001). Deste modo, Billingsley (1988) considerando o tempo de privação alimentar, descreve alterações estruturais semelhantes às descritas neste trabalho, indicando volumes maiores de grânulos de glicogênio nas células digestivas localizadas nas regiões anterior e posterior do intestino médio e aumento no volume de mitocôndrias e na área do RER no citoplasma das células digestivas da região anterior do intestino médio de *R. prolixus* aos 20 dias de privação alimentar, quando comparado com insetos com três dias de jejum. Ribeiro & Pereira (1984), também confirmaram a influência do ciclo alimentar sobre a atividade de diferentes enzimas no intestino médio de *R. prolixus*. Além disso, Andrade-Coêlho *et al.* (2001), observaram diferenças estruturais no RER, complexo de Golgi, microvilosidades, vesículas e labirinto basal conforme o tempo após repasto sanguíneo, nas células digestivas das regiões anterior e posterior do intestino médio de fêmeas de *Lutzomia intermedia* (Diptera: Phlebotominae).

Os resultados aqui obtidos indicam aumento no número de vesículas nas células digestivas do intestino médio de animais sujeitos a maior tempo de jejum o que pode estar relacionado ao fato dos insetos hematófagos não terem alimento constantemente disponível como ocorre com fitófagos. Assim, os hematófagos necessitam de uma reserva de enzimas, provavelmente armazenadas nas vesículas elétron-densas que serão prontamente utilizadas quando do encontro da fonte alimentar, como observado em Hemiptera (Fialho *et al.*, 2009) e Coleoptera predadores (Pradhan, 1940) e em adultos de holometábolos recém-emergidos (Serrão & Cruz-Landim, 1996)

A membrana perimicrovilar foi encontrada em todos os compartimentos do intestino médio de *T. vitticeps*, sendo que aos vinte cinco dias após o repasto ocorreram áreas descontínuas, indicando que esta membrana sofre degeneração a medida que o tempo após o repasto aumenta, similarmente ao encontrado em *R. prolixus* (Billingsley & Downe, 1986b), *C. hemipterus* (Azevedo, no prelo). Albuquerque-Cunha *et al.* (2008) afirmam que as membranas perimicrovillares de *R. prolixus* revestem completamente e de forma mais evidente a superfície apical das células digestivas dez dias após repasto sanguíneo. Os resultados aqui obtidos são semelhantes, pois indicam que nos exemplares de *T. vitticeps* com sete dias de jejum, as microvilosidades ainda não estão completamente revestidas por membrana perimicrovilar. No predador *B. tabidus* a presença de membrana perimicrovilar revestindo as microvilosidades das células digestivas ao longo do intestino médio é constitutiva e sem nenhuma influência da dieta ou do período de jejum alimentar (Fialho *et al.*, 2009). Desta maneira, hemípteros hematófagos e predadores desenvolveram mecanismos diferentes para controlar a síntese de membrana perimicrovilar.

A musculatura dividida em duas camadas, circular interna e longitudinal externa pode ser observada em todos os três compartimentos, sendo evidente principalmente aos vinte dias de privação alimentar e ficando menos nítida esta separação conforme o volume de sangue em seu lúmen. Estas modificações ocorrem como resultado da distensão que o volume alimentar provoca sobre a parede do intestino médio.

A presença de células na região posterior do intestino médio com sinais de degeneração em *T. vitticeps* após período de 25 dias de jejum, pode estar relacionada aos processos fisiológicos. Processos degenerativos em células do intestino médio de insetos são descritos em diferentes eventos fisiológicos como a metamorfose (Tetamantti *et al.*, 2007) e a digestão de nutrientes que liberam substâncias tóxicas que promovem a morte celular (Okuda *et al.*, 2007; Jarial, 2005). Em todos esses eventos é descrito a presença de células digestivas com aspecto apoptótico e ou necrótico, que são liberadas para o lúmen do intestino médio, sendo substituídas por células diferenciadas a partir das células regenerativas (Cruz-Landim *et al.*, 1996b; Billingsley & Lehane, 1996, Neves *et al.*, 2003; Tetamantti *et al.*, 2007, Rost-Roszkowska, 2008, Fialho *et al.*, 2009).

As características morfofisiológicas dos diferentes compartimentos do intestino médio de *Triatoma vitticeps* aqui apresentadas e a semelhança com outras espécies de hemípteros hematófagos como *C. hemipterus* (Azevedo, no prelo), *R. prolixus* (Billingsley & Downe,

1988), *T. infestans* (Burgos & Gutierrez, 1976), com o sugador de seiva *L. hesperus* (Habibi *et al.*, 2008) , com o predador *B. tabidus* (Fialho *et al.*, 2009) e com o onívoro *C. bifida* (Jarial, 2005), sugerem a origem de um ancestral comum para estes insetos. Dentre os insetos hemimetábolos, os hemípteros representam um dos grupos mais bem sucedidos e mais numerosos, compreendendo três subordens: Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha todos herbívoros, sendo grande parte deles sugadores de seiva e os Heteroptera que incluem insetos hematófagos, predadores e fitófagos (revisto por Damasceno-Sá & Silva, 2007). O ancestral dos hemípteros deve ter sido um sugador de seiva semelhante aos Sternorrhyncha atuais, pois a perda de membrana peritrófica nesta ordem estaria relacionada à adaptação de seus ancestrais à alimentação de floema (Goodchild, 1966; Terra *et al.*, 2006). A membrana perimicrovilar deve ter surgido em Condylgnatha, que é o ancestral comum de Thysanoptera e Hemiptera, que teria perdido a membrana peritrófica e enzimas digestivas envolvidas na digestão inicial e intermediária (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 1994, Silva *et al.* 2004; Terra *et al.*, 2006).

## 5- CONCLUSÃO:

O intestino médio de *T. vitticeps* apresentou diferenças nas células digestivas associadas ao tempo de jejum alimentar. Microvilosidades, membrana perimicrovilar e labirinto basal estão presentes nas células digestivas ao longo de todo o intestino médio, podendo apresentar variações devido às funções específicas de cada região e ao tempo após repasto sanguíneo. A partir dos dados aqui obtidos, sugere-se que a região anterior do intestino médio armazena substâncias, transporta fluidos e íons e participa da digestão de carboidratos e da hemólise, enquanto as regiões mediana e posterior do intestino médio, tem função na síntese e secreção de enzimas. Além disso, a região posterior tem participação na digestão de sangue e absorção de nutrientes. A semelhança entre o intestino médio do *T. vitticeps* com outros hemípteros sugerem que estes são provenientes de um ancestral comum e que as características morfológicas de seu intestino médio descritas, relacionam-se mais com aspectos da filogenia do que ao tipo de alimentação.

# CAPÍTULO 2

**Células endócrinas e regenerativas no intestino médio de *Triatoma vitticeps*  
em diferentes períodos de jejum alimentar**

## RESUMO

O intestino médio dos insetos apresenta-se revestido por um epitélio simples onde ocorrem três tipos celulares: células digestivas, endócrinas e regenerativas. Vários autores afirmam a relação entre os aspectos morfológicos das células digestivas e o tempo após repasto. Este trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência de células regenerativas e células endócrinas positivas para FMRFamida nas diferentes regiões do intestino médio de fêmeas e machos do hemíptero hematófago *Triatoma vitticeps* em diferentes períodos após repasto sanguíneo. Utilizou-se de doze insetos adultos de ambos os sexos, cujos intestinos médios foram retirados após 4, 72, 120, 168, 288, 360 e 600 horas após a alimentação. O intestino médio foi dividido nas regiões anterior, mediana e posterior e os fragmentos foram submetidos à marcação em bloco com antiFMRFamida e incluídos em resina. Foram analisadas dez lâminas para cada região do intestino médio de cada animal e em cada período de privação alimentar. Para a morfometria foi utilizado retículo com 100 pontos e o material observado em microscopia de luz com objetiva de 40x a fim de contabilizar o número de núcleos de células digestivas, núcleos de células endócrinas positivas para FMRFamida, núcleos de células regenerativas. Os resultados indicaram a presença de células enteroendócrinas do tipo aberta e positivas para FMRFamida no intestino médio de *T. vitticeps*. Existe associação entre o ciclo alimentar, ou seja, o período necessário para a digestão do sangue, e a frequência de células endócrinas positivas para FMRFamida e de células regenerativas no intestino médio de *T. vitticeps*. Ocorrem também diferenças no padrão de distribuição destas células entre machos e fêmeas e nas diferentes regiões do intestino médio.

**Palavra chave:** FMRFamida, intestino médio, células endócrinas, *T. vitticeps*

## ABSTRACT

The midgut of insects has three cell types: digestive, endocrine and regenerative cells and a relationship between cell morphology and blood meal have been suggested. This study aimed to evaluate the occurrence of regenerative and endocrine cells positive for FMRFamide in different regions of the midgut of females and males of *Triatoma vitticeps* at different periods after blood meal. Twelve adult insects of both sexes, were dissected 4, 72, 120, 168, 288, 360 and 600 hours after feeding and the midgut isolated. The midgut was divided into the regions anterior, middle and posterior and the fragments were analyzed in light microscope. We analyzed ten slides for each midgut region of each animal in each period of food deprivation. For morphometrics a reticulum with 100 points in a light microscope with the 40x objective was used to count the number of nucleus of digestive cells, FMRF-amid positive endocrine cells and nuclei of regenerative cells. The results showed the presence of endocrine cells of open type and positive for FMRFamide in the midgut of *T. vitticeps*. There was association between the food cycle (the time required for digestion of blood) and the frequency of FMRFamide positive cells and regenerative cells in the midgut of *T. vitticeps*. Differences in the pattern of distribution of these cells between males and females and in different regions of the midgut were also observed.

**Key words:** FMRFamide, midgut, endocrine cells, *T. vitticeps*.

## 1- INTRODUÇÃO

O intestino médio de *Triatoma vitticeps*, assim como de outros hemípteros e nos demais insetos, é revestido por epitélio simples colunar onde se distinguem três tipos celulares: as células digestivas, as endócrinas e as regenerativas (Cruz Landim, 1985, Serrão 2000; Neves 2002).

As células endócrinas caracterizam-se principalmente pela presença de grânulos dispostos na região infra-nuclear. Podem apresentar-se como células do tipo fechadas, que não fazem contato com o lúmen intestinal, ou como células do tipo abertas, cujo ápice alcança o lúmen e apresenta microvilosidades (Chapman, 1998; Nation, 2002; Neves *et al.*, 2003).

Segundo Endo & Nishiitsutsuji-Uwo (1981) as células endócrinas observadas em insetos correspondem morfológica e imunohistoquimicamente as células endócrinas do sistema digestório de vertebrados, pois estes tipos celulares caracterizam-se sempre pela presença de granulação basal e os anticorpos que identificam neuropeptídeos de mamíferos também indicam a presença de peptídeos semelhantes em insetos.

A presença de células endócrinas na parede do intestino médio de diferentes ordens de insetos tem sido reportada. Em Orthoptera, a presença de células endócrinas do tipo aberta foi confirmada nas regiões anterior e posterior do intestino médio (Lange & Orchard, 1998; Lange, 2001) e na ampola retal de *Locusta migratoria* (Zudaire *et al.*, 1998). Entre os Phasmatodea, *Carausius morosus* apresenta células endócrinas que foram marcadas com anticorpos anti-FMRFamida (Zitnan *et al.*, 1993) e anti-colecistocinina (Andriés & Beauvillain, 1988). Em Blattaria, Endo & Nishiitsutsuji-uwo (1981), descrevem a presença de células endócrinas no intestino médio de *Periplaneta americana*, sendo a maioria delas identificadas como do tipo fechada, já em *Blaberus craniifer* foram observadas no intestino médio células endócrinas, tanto do tipo aberto, quanto fechado (Andriés & Tramu, 1985). Vários autores confirmam a existência de células endócrinas em Lepidoptera, ocorrendo em *Manduca sexta* (Zitnan *et al.*, 1995), em *Helicoverpa zea* (Huang *et al.*, 1998) e em *Antheraea yamamai* (An *et al.*, 1998). Entre os Diptera, células endócrinas no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti* foram descritas em fêmeas adultas por Veenstra (1999) e em larvas, pupas e adultos (Moffett & Moffett, 2005).

Neves *et al.* (2003) descreveram a ultra-estrutura de células endócrinas do tipo aberta e fechada, localizadas principalmente na região posterior intestino médio da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*. A presença dos dois tipos de células endócrinas no intestino

médio em Hymenoptera, foi antes citada por Raes & Verbeket (1994) que analisou a morfologia do intestino médio de *Apis mellifera*.

Alguns autores anunciaram a presença de células endócrinas no intestino médio de Hemiptera. No predador *B. tabidus* (Fialho *et al.*, 2009) ou no hematófago *C. hemipterus* (Azevedo *et al.*, in press) as células endócrinas foram descritas como do tipo aberto, contendo em seu citoplasma grânulos com elétron-densidade média e mitocôndrias, além de vacúolos elétron-lucentes e figuras mielínicas na porção basal. Diferentes autores reportaram para a ocorrência de células endócrinas no intestino médio de triatomíneos, como Billingsley & Downe (1986). Segundo esses autores, as células endócrinas em *R. prolixus* localizam-se nas regiões média e posterior do intestino médio, distribuindo-se de forma esparsa entre as células digestivas e regenerativas, sem formar grupos e sem se associarem aos ninhos das células regenerativas. Essas células foram classificadas como do tipo fechado. Zitnan *et al.* (1993) também descreveram a ultra-estrutura de células endócrinas no intestino médio de *R. prolixus*, observando em seu intestino posterior células abertas e fechadas.

Vários trabalhos apontaram para marcação positiva de diferentes famílias de neuropeptídeos nas células entero-endócrinas do intestino médio de insetos, como por exemplo, FMRFamida, colecistocinina, taquiquininas, allostatina, peptídeos semelhantes ao glucagon, gastrina, substância P e urotensina I (Andriés & Tramu, 1985; Andriés & Beauvillain, 1988; Zitnan *et al.*, 1993; Veenstra & Lambrou, 1995; Miksys *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; Zudaire *et al.*, 1998; Lange, 2001; Harshini *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2003; Moffett & Moffett, 2005). No entanto, o preciso papel biológico desses peptídeos não está claro, embora seja sugerido que a modulação de sua liberação possa estar relacionada com alterações fisiológicas causadas pela alimentação, pela privação alimentar e parasitismo (Zitnan *et al.*, 1995; Zudaire *et al.*, 1998; Lange, 2001). Segundo Sehnal & Zitnan (1996), as células endócrinas de insetos deveriam cumprir importante papel no controle do peristaltismo, na digestão, no crescimento e na reprodução de insetos.

O isolamento e identificação do FMRFamida (Phe-Mer-Arg-Phe-amide) como um tetrapeptídeo cardio-estimulador foi feita pela primeira vez em um celenterado por Price & Greenberg (1977), posteriormente foi identificado em outros invertebrados, inclusive em insetos (Zitnan *et al.*, 1995; Lange, 2001; Harshini *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2002; Hill & Orchard, 2004). Assim, Hill & Orchard (2004), mostraram que o ciclo alimentar e a variação na dieta interferem no aparecimento de peptídeos relacionados ao FMRFamida no intestino

de *L. migratoria*, o que sugere a participação deste neuropeptídeo na manutenção do balanço do conteúdo nutricional neste inseto. Neves *et al.* (2002) estudaram a presença de diferentes peptídeos reguladores nas células endócrinas do intestino médio durante a metamorfose em *M. quadrifasciata anthidioides*, entre eles o FMRFamida. Concluíram que este peptídeo estava presente em todos os insetos, principalmente nos períodos próximos a alimentação, o que sugere seu papel no controle dos processos da digestão.

O ciclo alimentar influencia também a concentração de FMRFamida e peptídeos relacionados a taquiquinina em células endócrinas do intestino médio de *L. migratoria* de forma diferenciada, de maneira que a marcação para FMRFamida diminui significativamente vinte e quatro horas após jejum, enquanto a imunoreatividade para taquiquinina diminui após 48 horas de privação alimentar (Lange, 2001).

Em larvas de *Opisina arenosella* os peptídeos relacionados à FxRFamide poderiam estimular a liberação de amilase e protease no intestino médio (Harshini *et al.*, 2002), o que indicaria sua participação nos processos digestivos. Em larvas de *M. sexta* parasitadas com *Cotesia congregata*, o peptídeo FMRFamida, foi produzido em um número significativamente maior de células endócrinas que em larvas não parasitadas. Tal fato ocorreria possivelmente devido a supressão da taxa de liberação do peptídeo ou então de sua síntese pela presença do parasito (Zitnan *et al.* 1995).

Em insetos, assim como em todos os outros metazoários, a homeostase é fundamental para a morfogênese e para a manutenção da arquitetura e da fisiologia dos tecidos. Nos diferentes grupos animais, o trato gastrointestinal caracteriza-se pela grande reciclagem de células que compõem seu epitélio, desta maneira, a homeostase é garantida pelo controle de atividades complexas como morte celular programada, proliferação e diferenciação celular (Potten *et al.*, 1997; Brittan & Wright, 2002).

Estudos relativos à manutenção do epitélio intestinal a partir de células tronco gastrointestinais utilizam diferentes grupos de animais como modelo experimental, entre eles, os mamíferos (Martin *et al.*, 1998; Slorach *et al.*, 1999; Bjerknes & Cheng, 2001; Leedham *et al.*, 2005), anfíbios (Ishizuya-Oka, 2007) e insetos (Ohlstein & Spradling, 2007; Martins *et al.*, 2006; Illa-Bochaca & Montuega 2006).

Segundo Ohlstein & Spradling (2007) o epitélio do intestino médio de *Drosophila melanogaster* continha células tronco intestinais multipotentes que se distribuíam

esparadamente ao longo da membrana basal e que poderiam gerar tanto células digestivas como células endócrinas.

As células tronco no intestino médio de insetos são denominadas células regenerativas e localizam-se em agrupamentos denominados ninhos, ou isoladamente, no epitélio de revestimento.

Conforme revisto por Leedhan *et al.* (2005), os processos de proliferação e diferenciação das células tronco envolviam uma série de fatores de crescimento e de citocinas produzidas por células vizinhas. Além disso, tais células se dividiriam através de divisões assimétricas com a formação de uma célula tronco e outra célula filha. As células progenitoras manteriam a capacidade de dividir até que elas se diferenciem de forma terminal. Divisões simétricas também poderiam ocorrer ocasionalmente, produzindo diferentes resultados como duas células filhas comprometidas com a diferenciação ou duas células tronco. Na maioria das vezes, as células-tronco se dividem de forma determinística ou assimétrica, mas a maneira que esta irá se dividir depende dos fatores liberados pelas células vizinhas ao nicho de células tronco, possibilitando a comunicação celular (Potten & Loeffler, 1990; Potten *et al.*, 2002).

A compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no ciclo alimentar dos insetos será maior na medida em que se possa desvendar o papel das diferentes células que compõem o epitélio do intestino médio e os possíveis fatores que afetam seu funcionamento. As células endócrinas e a identificação de peptídeos reguladores produzidos por elas, bem como aspectos de regeneração do epitélio do intestino médio em triatomíneos se restringem aos descritos para *R. prolixus* (Billingsley & Downe 1986; Zitnan *et al.*, 1993).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais:

Avaliar a distribuição das células endócrinas e regenerativas nos diferentes compartimentos do intestino médio do hemíptero hematófago *Triatoma vitticeps* e se esta distribuição se altera em função do tempo após repasto sangüíneo.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Identificar e caracterizar as células endócrinas nos diferentes compartimentos do intestino médio do triatomíneo em diferentes períodos após alimentação.
- Avaliar a frequência de células endócrinas e das células regenerativas nos diferentes compartimentos do intestino médio do triatomíneo e em diferentes períodos após alimentação.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais:

Doze insetos adultos de ambos os sexos de *T. vitticeps* foram cedidos pelo Instituto Renné Rachou – FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais. Os animais foram mantidos em colônias no Laboratório de Entomologia do Centro Universitário de Caratinga,(UNEC) , Caratinga, MG a 28 °C e umidade relativa de 60%. Após 15 dias de jejum, os insetos alimentaram-se de sangue, sobre ratos (*Rattus norvegicus*) previamente anestesiados. Após o repasto sanguíneo, os insetos foram dissecados em solução de NaCl 125 mM 4, 72, 120, 168, 288, 360 e 600 horas após a alimentação para remoção do intestino médio que foi dividido nas regiões anterior, mediana e posterior.

### 2.2 Histologia e Imunohistoquímica:

Para as análises imunohistoquímicas das células endócrinas FMRFamida positivas, fragmentos das diferentes regiões do trato digestivo foram fixados em solução de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 30 min. Após lavagem em tampão fosfato de sódio contendo 1% de Tween-20 (PBST), as amostras foram imersas em solução de fenilhidrazina a 1% por 40 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Os fragmentos foram novamente lavados em PBST, transferidos para soro albumina bovina 1,5% em PBST por 10 min. e incubados em soro normal de cabra a 2% em PBST por 20 min. Novamente as amostras foram lavadas em PBST e incubadas em anticorpo primário anti-FMRFamida produzido em coelho (Peninsula Lab.) 1:100 em PBST por 24 horas a 4 °C. Então as amostras foram incubadas em anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (1:20) em PBST por 3 horas em temperatura ambiente e submetidas à revelação da peroxidase com diaminobenzidina. Seguiu-se a desidratação em série alcoólica crescente e inclusão em glicol-metacrilato (Historesin Leica). Secções com 2 µm de espessura foram contra-coradas com *fast red* por 10 minutos e analisadas em microscópio de luz. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo anti-FMRFamida.

#### *2.4. Contagem de células enteroendócrinas positivas para FMRFamida e células regenerativas:*

Para a contagem das células foram montadas 10 lâminas de cada animal. Cada lâmina contendo 12 secções histológicas, totalizando 120 secções de cada região do intestino médio para cada animal em cada período de jejum alimentar. Para análise morfométrica utilizou-se microscópio de luz, com objetiva de 40x e com ocular reticulada com 100 pontos. Foram analisadas 10 secções por animal, por região do intestino médio e para cada tempo após repasto sanguíneo, considerando 10 campos por secção. Desta maneira, totalizou-se 1000 campos por região de cada animal e em cada intervalo de tempo após repasto. As secções analisadas distavam em pelo menos 60 micrômetros uma das outras, para evitar que se contassem as mesmas células. Nas contagens os núcleos de células positivas para anti-FMRFamida, núcleos de células negativas para anti-FMRFamida, células regenerativas e outros (camada muscular, traquéias e túbulos de Malpighi) foram considerados.

#### *2.5. Análise estatística:*

Para a análise estatística, os tempos de privação alimentar foram distribuídos em classes. As associações entre tempo/sexo, sexo/região do intestino médio, sexo/tipos celulares foram submetidas ao teste de Qui-quadrado. As proporções das variáveis repostas (núcleos de células digestivas, células regenerativas, células endócrinas e outros parâmetros) obtidas nas regiões do intestino médio foram testadas para igualdade de proporção pelo teste de Qui-quadrado.

### 3. RESULTADOS

A presença de células endócrinas do tipo aberta foi identificada nas regiões anterior, média e posterior do intestino médio de *T. vitticeps* (Tabela 3, Figura 17 A-E). A especificidade da reação para FMRFamida foi obtida por comparação com o controle negativo (Figura 17 F e G).

De uma maneira geral as células digestivas foram as mais frequentes, seguidas pelas células regenerativas e as endócrinas. Quando se comparou a frequência dos tipos celulares e das estruturas teciduais nas três porções do intestino médio, observou-se que estas se distribuíam com percentuais significativamente diferentes em cada região, Além disso, comparando as diferentes regiões, percebeu-se que a porção mediana apresentou frequência significativamente maior de células digestivas em relação às outras regiões, enquanto que a maior frequência de células regenerativas foi observada na região posterior. As frequências de células endócrinas foram semelhantes nas diferentes regiões do intestino médio (Tabela 3).

**Tabela 3.** Frequência dos diferentes tipos celulares e estruturas teciduais presentes no epitélio do intestino médio de *Triatoma vitticeps* (N=12) em relação as suas diferentes regiões e sem considerar o sexo. Dados observados numa área padrão de  $12 \times 10^4 \text{mm}^2$  por região do intestino.

Variáveis*	Intestino médio anterior	Intestino médio médio	Intestino médio posterior	Qui-quadrado <sup>▲</sup>
	n (%)	n (%)	n (%)	
Células Endócrinas	32 (0,03) <sup>Dd</sup>	42 (0,04) <sup>Dd</sup>	21 (0,02) <sup>Dd</sup>	9,5
Células Digestivas	9599 (8,0) <sup>Bb</sup>	10787 (8,99) <sup>Ba</sup>	9563 (7,97) <sup>Bc</sup>	97,2
Células regenerativas	293 (0,24) <sup>Cc</sup>	363 (0,30) <sup>Cb</sup>	411 (0,34) <sup>Ca</sup>	19,8
Outros (células musculares, tubos de Malpighi, traquéias, etc)	110076 (91,73) <sup>Aa</sup>	108812 (90,67) <sup>Aa</sup>	110002 (91,67) <sup>Aa</sup>	9,1
Total	119995 (100)	120008 (100)	119997 (100)	
<b>Qui-quadrado<sup>•</sup></b>	286950,4	278516,9	286415,2	

\* Qui-quadrado calculado de 143,09 é significativo para a associação entre as variáveis estudadas.

•▲ Valor de Qui-quadrado significativo indicando que a frequência de células diferiu em relação a região do intestino médio. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado

No intestino médio de fêmeas e machos, os diferentes tipos de células epiteliais e outras estruturas que integram este órgão ocorreram com frequências diferentes. Assim, os valores mais elevados foram registrados para o parâmetro identificado como “outros” e para as células digestivas. Na comparação entre machos e fêmeas, ocorreram diferenças nas frequências de células digestivas e células regenerativas, com os machos apresentando valores maiores para as células digestivas e as fêmeas com presença de maior número de células regenerativas (Tabela 4). No entanto, diferenças significativas nas frequências de células endócrinas em relação ao sexo puderam ser observadas quando se consideraram os diferentes períodos após repasto sangüíneo, com as fêmeas apresentando mais células positivas para FMRFamida nos intervalos de 4 a 143 e 312 a 600 horas em relação aos machos (Tabela 5).

Tanto em machos quanto em fêmeas de *T. vitticeps*, as diferentes regiões do intestino médio apresentaram diferentes frequências para células endócrinas. Os machos mostraram maior número de células positivas para FMRFamida na região mediana do intestino médio, já nas fêmeas este valor maior ocorreu na porção anterior. O intestino médio posterior teve o menor número de células endócrinas de todo o intestino médio, apresentando frequências semelhantes entre machos e fêmeas (tabela 6).

**Tabela 4.** Frequência dos diferentes tipos celulares presentes no epitélio do intestino médio de *Triatoma vitticeps* (N=12) segundo o sexo. Dados observados numa área padrão de 6 x 10<sup>4</sup> mm<sup>2</sup> em cada sexo.

Variáveis*	Machos	Fêmeas	Qui-quadrado <sup>▲</sup>
	n (%)	n (%)	
Células Endócrinas	47 (0,03) <sup>Dd</sup>	48 (0,03) <sup>Dd</sup>	0,011
Células Digestivas	15474 (8,59) <sup>Ba</sup>	14475 (8,03) <sup>Bb</sup>	33,32
Células Regenerativas	460 (0,26) <sup>Cb</sup>	607 (0,34) <sup>Ca</sup>	20,25
Outros (células musculares, tubos de Malpighi, traquéias, etc)	164075 (91,12) <sup>Aa</sup>	164865 (91,60) <sup>Aa</sup>	1,921
Total	180056 (100)	179995 (100)	
Qui-quadrado <sup>•</sup>	423318	428711	

\* Qui-quadrado calculado de 740155 é significativo para a associação entre as variáveis estudadas.

•▲ Valor de Qui-quadrado significativo indicando que a frequência de células na classe diferiu em relação ao sexo. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado

**Tabela 5.** *Frequência de células endócrinas em macho (N=6) e fêmea (N=6) de Triatoma vitticeps em diferentes intervalos de tempo após a alimentação. Dados observados numa área padrão de  $6 \times 10^4 \text{ mm}^2$  por classe e em cada sexo.*

Intervalos (horas após repasto)*	Machos	Fêmeas	Qui-quadrado <sup>▲</sup>
	n (%)	n (%)	
4 -143	7 (14,9) <sup>Bb</sup>	19 (39,6) <sup>Ba</sup>	6
144 – 311	40 (85,1) <sup>Aa</sup>	23 (47,9) <sup>Ab</sup>	5
312 – 600	0 (0) <sup>Cb</sup>	6 (12,5) <sup>Ca</sup>	6
Total	47 (100)	48 (100)	
<b>Qui-quadrado</b>	58	10	

\* Qui-quadrado calculado de 16 é significativo para a associação entre as variáveis estudadas.

•▲ Valores seguidos por diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado.

**Tabela 6.** *Frequência de células endócrinas em machos (N=6) e fêmeas (N=6) de Triatoma vitticeps nas diferentes regiões do intestino médio. Dados observados numa área padrão de 6 x 10<sup>4</sup> mm<sup>2</sup> por região do intestino médio e em cada sexo.*

Variáveis*	Machos	Fêmeas	Qui-quadrado <sup>▲</sup>
	n (%)	n (%)	
Intestino Médio Anterior	8 (17,0) <sup>Bb</sup>	24 (50,0) <sup>Aa</sup>	8
Intestino Médio Médio	31 (66,0) <sup>Aa</sup>	11 (22,9) <sup>Bb</sup>	9,5
Intestino Médio Posterior	8 (17,0) <sup>Bb</sup>	13 (27,1) <sup>Ba</sup>	1,2
Total	47 (100)	48 (100)	
<b>Qui-quadrado<sup>•</sup></b>	6,1	22,5	

\* Qui-quadrado calculado de 18,7 é significativo para a associação entre as variáveis estudadas.

•▲Valores seguidos por letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado.

As células regenerativas foram encontradas em maior frequência no intervalo de tempo de 312 a 600 horas após repasto. Destaca-se também que de quatro até 143 horas após alimentarem-se de sangue, as fêmeas e machos não mostraram diferenças nas frequências de células regenerativas. No entanto, a partir de 144 horas de jejum ocorreu aumento no número deste tipo celular em ambos os sexos, com as fêmeas apresentaram frequências maiores quando comparadas aquelas observadas nos machos (Tabela 7).

Em relação à frequência de células digestivas em machos e fêmeas nos diferentes momentos após alimentação, observaram-se variações na presença destes tipos celulares. Em ambos os sexos estas células apresentaram frequências menores na classe de tempo 143-311 horas de jejum alimentar, elevando-se novamente após 312 horas após o repasto. Além disso, os machos apresentaram frequências maiores de células digestivas nos períodos de 4-143 e 144-311 horas. Após 311 horas esta diferença entre os sexos não foi mais significativa (Tabela 8).

**Tabela 7.** *Frequência de células regenerativas considerando o sexo e o tempo em horas após o repasto sanguíneo em Triatoma vitticeps (N=12). Dados observados numa área padrão de 6 x 10<sup>4</sup> mm<sup>2</sup> por classe e em cada sexo.*

Intervalos (horas após repasto)*	Machos	Fêmeas	Qui-quadrado <sup>▲</sup>
	n (%)	n (%)	
4 - 143	174 (37,83) <sup>Aa</sup>	149 (24,54) <sup>Ca</sup>	1,9
144 - 311	130 (28,26) <sup>Cb</sup>	208 (34,27) <sup>Ba</sup>	18
312 - 600	156 (33,91) <sup>Bb</sup>	250 (41,19) <sup>Aa</sup>	21,8
Total	460 (100)	607 (100)	
<b>Qui-quadrado<sup>•</sup></b>	6,4	25,5	

\* Qui-quadrado calculado de 21,9 é significativo para a associação entre as variáveis estudadas.

•▲ Valores seguidos por letras minúscula diferentes nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado. Valores seguidos por letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado.

**Tabela 8.** Frequência de células digestivas considerando o sexo e o tempo em horas após o repasto sanguíneo em *Triatoma vitticeps* (N=12). Dados observados numa área de 6 x 10<sup>4</sup> mm<sup>2</sup> por classe e em cada sexo.

Intervalo (horas após repasto)*	Machos	Fêmeas	Qui-quadrado <sup>▲</sup>
	n (%)	n (%)	
4 - 143	6199 (40,06) <sup>Aa</sup>	5558 (38,40) <sup>Ab</sup>	34,9
144 - 311	4206 (27,18) <sup>Ca</sup>	3895 (26,91) <sup>Cb</sup>	11,9
312 - 600	5069 (32,76) <sup>Ba</sup>	5022 (34,69) <sup>Ba</sup>	0,2
Total	15474 (100)	14475 (100)	
<b>Qui-quadrado<sup>•</sup></b>	297	387	

\* Qui-quadrado calculado de 13,8 é significativo para a associação entre as variáveis estudadas.

•▲ Valores seguidos por letras minúscula diferentes nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado. Valores seguidos por letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste de Qui-quadrado.

## FIGURA 17

**Secções histológicas do intestino médio de *Triatoma vitticeps* mostrando células endócrinas positivas para FMRFamida em diferentes períodos de jejum alimentar. Barras: 10  $\mu$ m.**

A - Intestino médio anterior 72 horas após repasto.

B - Intestino médio anterior 72 horas após repasto.

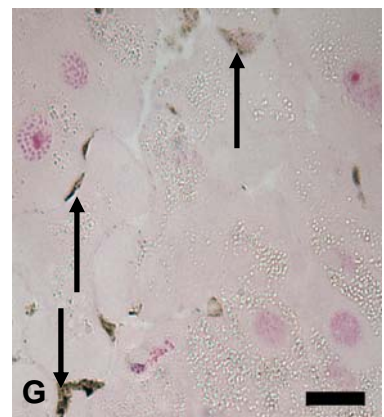
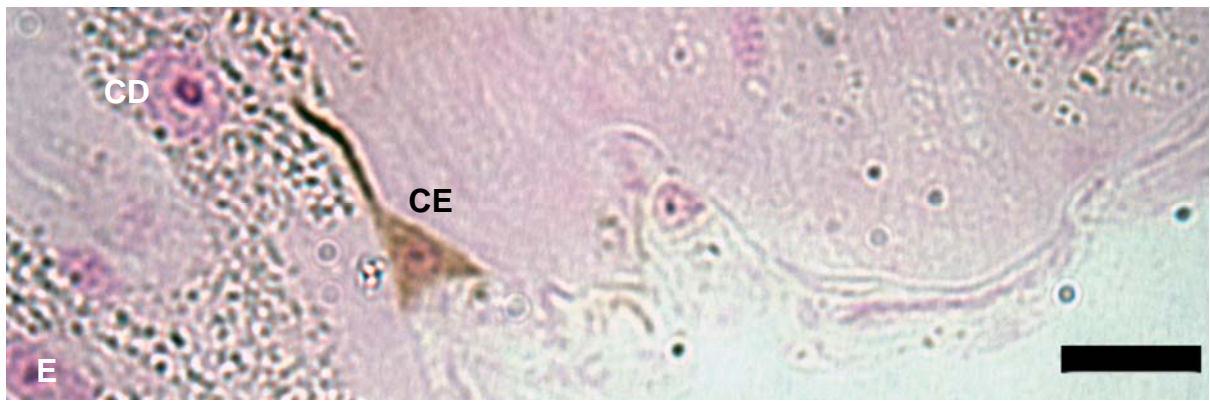
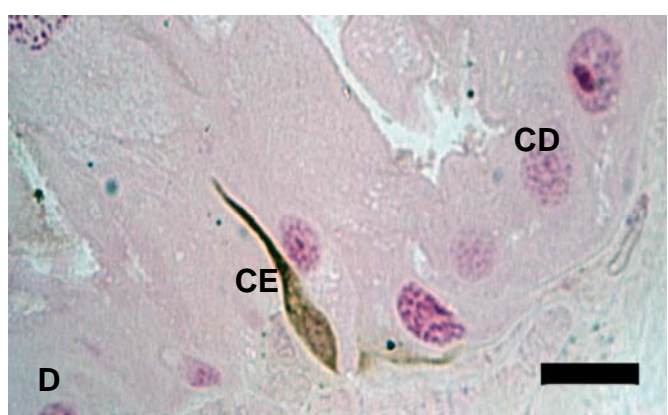
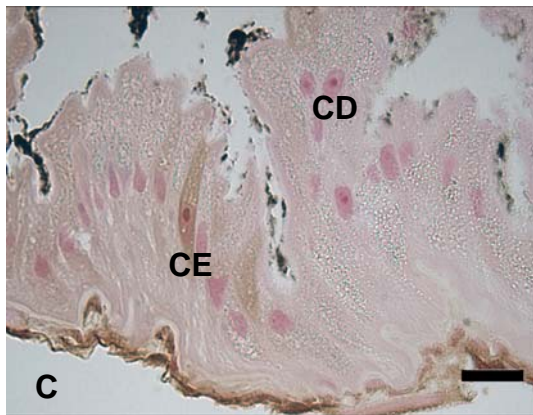
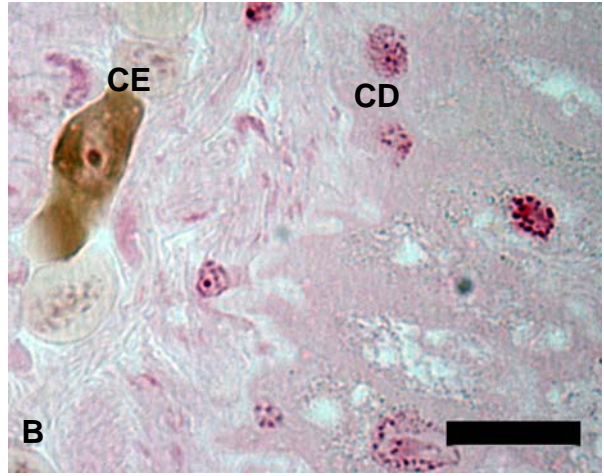
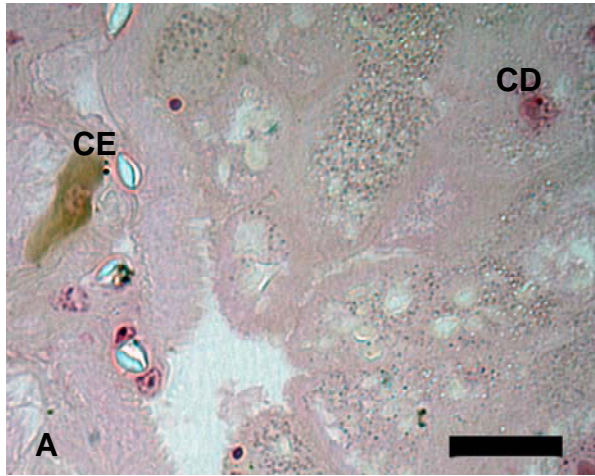
C – Região mediana do intestino médio 168 horas de jejum alimentar.

D – Região mediana do intestino médio 168 horas de jejum alimentar.

E – Região mediana do intestino médio 168 horas de jejum alimentar.

F – Controle negativo no intestino médio anterior de inseto aos 72 horas após alimentar com sangue.

G – Controle negativo na região mediana do intestino médio com 168 horas após repasto. Em todas as figuras CE: células endócrinas; CD: células digestivas e setas: marcação inespecífica.



#### 4- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicaram a presença de células endócrinas do tipo aberta e positivas para FMRFamida no intestino médio de *T. vitticeps*, cujas frequências estão associadas ao tempo de jejum alimentar e a região do intestino médio. As frequências de células regenerativas e digestivas também apresentaram associações com os parâmetros citados. Além disso, o padrão de distribuição das frequências para os três tipos celulares ocorreram com picos distribuídos em intervalos diferentes após repasto, seja quando se consideraram estes valores em relação ao sexo do triatomíneo ou em relação à região do intestino médio.

A presença do peptídeo FMRFamida nas células endócrinas do intestino médio foi registrada para outras espécies de insetos (Zitnan *et al.*, 1995; Neves *et al.* 2002; Harshini *et al.*, 2002). No hemíptero *R. prolixus* a presença de células endócrinas FMRFamida positivas foi confirmada por Zitnan *et al.* (1993) e Billingsley & Downe (1996), como células existentes principalmente na região posterior do intestino médio e que se caracterizavam por ocorrerem como células do tipo aberto ou fechado. As células endócrinas localizadas pela imunohistoquímica no intestino médio do *T. vitticeps* utilizados neste trabalho, se caracterizaram como do tipo aberta, conforme descrito por Zitnan *et al.* (1993), com predominância na região mediana do intestino médio. As variações entre estes resultados e aqueles apresentados por Billingsley & Downe (1996) pode ser explicado pela diferença nas divisões em regiões do intestino médio consideradas. Desta maneira, no presente trabalho, considerou-se o intestino médio organizado em três regiões que diferem tanto estrutural como fisiologicamente, enquanto que Billingsley & Downe (1996) consideraram o intestino médio separado em dois compartimentos apenas, a região anterior e a região posterior, desconsiderando assim os aspectos morfofisiológicos diferentes das regiões mediana e posterior.

Em *T. vitticeps* observou-se a presença de células endócrinas do tipo aberta, cujas frequências variavam ao longo do ciclo alimentar conforme a região do intestino médio e do sexo do triatomíneo. Tal resultado sugere a diversidade de funções que estes tipos celulares marcados positivamente com FMRFamida poderiam exercer no intestino médio deste inseto durante a digestão. Conforme o descrito por outros autores como Moffett & Moffett (2005) que caracterizam as células endócrinas em *Aedes aegypti* como células do epitélio intestinal

em que faltam axônios, apresentando formas diversas, o que reflete uma população heterogênea, que podiam agir de forma parácrina, ao regular as funções digestivas de células epiteliais vizinhas e das camadas musculares e de maneira endócrina, ao eliminar sua secreção na hemolinfa. Esta secreção endócrina informaria sobre o volume e a composição da dieta, ao sistema nervoso, a outras regiões do intestino e também ao corpo gorduroso, atuando assim como hormônios ou neuro-hormônios. As células do tipo aberta, através de suas projeções, liberariam substâncias no espaço peritrófico, atuando como moduladoras dos processos digestivos, ou então, como células sensoriais ao regular a liberação de peptídeos de outras terminações celulares. Ao considerar os diferentes tipos de células endócrinas e seu papel na digestão, Fujita *et al.* (1977) afirmaram que as células endócrinas do tipo aberta agem como sensores primários que registram a presença do alimento e nutrientes, enquanto que as do tipo fechado perceberiam as variações no volume do intestino.

A frequência encontrada para os diferentes tipos celulares que compõem o epitélio do intestino médio de *T. vitticeps* foi coerente com o descrito por Billingsley & Downe (1986), que também afirmaram que as células digestivas são as mais numerosas e que as células endócrinas são menos frequentes do que os outros tipos celulares do epitélio que reveste o intestino médio de *R. prolixus*. Neste sentido, pode-se sugerir que as células endócrinas devem estar presentes em todos os insetos, de maneira que relatos sobre ausência deste tipo celular no intestino médio dos insetos devem ser vistos com cautela. devido à sua baixa frequência.

Em *A. aegypti* a região posterior do intestino médio (estômago posterior) das fêmeas é duas vezes maior do que o do macho em jejum, e apresentavam maior frequência, densidade e tamanho de células endócrinas (Moffett & Moffett 2005) quando comparadas aos machos. Lange & Orchard (1998) encontraram maior positividade para FMRFamida no intestino médio de fêmea de *L. migratoria* quando comparado com os machos, porém não discutiram estes resultados. Ao contrário desses insetos, fêmeas e machos de *T. vitticeps* apresentaram frequências totais de células endócrinas semelhantes ao longo de todo o intestino médio, apesar das diferenças nas frequências terem sido registradas em cada um dos períodos de tempo após repasto. Uma menor frequência de células endócrinas positivas para FMRFamida sugere a diminuição nos níveis deste peptídeo na região mediana do intestino médio das fêmeas. Tal fato, poderia estar relacionado a maior liberação do peptídeo na hemolinfa das fêmeas. Desta maneira, a menor frequência de células endócrinas positivas para FMRFamida

na região mediana do intestino médio das fêmeas de *T. vitticeps* pode estar associada com diferenças no metabolismo reprodutivo e no papel da alimentação neste processo em ambos os sexos, pois o estado nutricional dos triatomíneos tem pouco efeito sobre a atividade reprodutiva do macho (Khalifa, 1950, Régis *et al.* 1985), porém a deficiência de importantes fatores nutricionais do sangue pode influenciar na produção de ovos pelas fêmeas (Wigglesworth 1936).

A região mediana do intestino médio é reconhecidamente o principal sítio de síntese e secreção de enzimas do intestino médio de Hemiptera, seguida da região posterior que, para realizar a digestão final das proteínas do sangue, também necessita secretar enzimas (Wigglesworth, 1975; Houseman & Downe, 1983; Billingsley & Downe, 1983; Billingsley & Downe, 1988, Billingsley, 1990; Chapman, 1998, Nation, 2001; Borges *et al.*, 2006, Guedes *et al.*, 2007; Fialho *et al.*, 2009). Associado a estes fatos, tem-se o papel confirmado do FMRFamida na liberação *in vitro* de enzimas como tripsina e amilase em células isoladas do intestino médio de *O. arenosella* (Lepdoptera) (Harshini *et al.* 2002). A relação entre o FMRFamida e outros peptídeos reguladores da síntese e/ou liberação de enzimas no intestino médio foi sugerida para outros insetos (Broadway & Duffey; 1986; Lehane *et al.*, 1996; Nachman *et al.*, 1997; Neves *et al.*, 2003). Desta maneira, o processo digestivo em triatomíneos, assim como em outros insetos, envolve a ação de enzimas, cuja síntese e secreção talvez possam ser moduladas pelo peptídeo FMRFamida.

Apesar da alta prevalência de células imunorreativas para peptídeos semelhantes aqueles pertencentes a família do FMRFamida no intestino médio da maioria dos insetos estudados, sua função ainda não é totalmente conhecida (Merte & Nichols, 2002). A influência desses peptídeos nos processos digestivos pode estar relacionada à ação miotrópica sobre os músculos viscerais (Schoofs *et al.*, 1993; Geary *et al.*, 1999), além de atuarem na secreção de enzimas, no controle de água e eletrólitos (Veenstra *et al.*, 1995; Kingan *et al.*, 1997; Zudaire *et al.*, 1998; Merte & Nichols, 2002) e no balanço do conteúdo nutricional (Hill & Orchard, 2005, Bechtold & Luckman, 2007). Desta forma, as maiores frequências de células FMRFamida em intervalos diferentes do ciclo alimentar nas diferentes regiões do intestino médio aqui observados sugerem a ocorrência de diferentes tipos de peptídeos reguladores pertencentes a família do FMRFamida, que apresentam funções variadas e agindo de forma distinta nas diferentes regiões do intestino médio do *T. vitticeps*.

A secreção de enzimas pelas células digestivas do intestino médio se dá de forma apócrina/holócrina, o que demanda constante perda de células e necessidade de reposição a partir da ação das células regenerativas (Chapman, 1998; Nation, 2000). Além disso, a digestão de sangue gera subprodutos como radicais livres e o grupo heme que são tóxicos para as células, promovendo a morte destas (Okuda *et al.*, 2005; Jarial, 2005; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Billingsley & Lehane, 1996, Neves *et al.*, 2003; Tetamantti *et al.*, 2007, Rost-Roszkowska, 2008, Fialho *et al.*, 2009, Azevedo *et al.* no prelo). A diminuição de células digestivas entre os triatomíneos no intervalo de 144 a 311 horas após repasto sangüíneo pode ser devido esta perda de células do epitélio do intestino médio devido ao desgaste sofrido pelo processo digestivo e absoritivo.

A presença de células regenerativas com maior frequência a partir de 312 h após repasto, provavelmente, é determinado pela necessidade maior de reposição celular devido à crescente perda celular ao longo ciclo alimentar, fomentada pela forma de secreção de enzimas e/ou pela atuação de radicais livres.

Apesar do tamanho maior da fêmea de *T. vitticeps* (Lent & Wycodzindky, 1979), a frequência maior de células regenerativas nos insetos deste sexo quando comparada com os machos, só podem ser confirmados após trabalhos posteriores que avaliem parâmetros como a altura e a densidade deste tipo celular em indivíduos de sexo diferente.

Se as regiões mediana e posterior do intestino médio são os locais de maior produção e secreção de enzimas digestivas além de sofrerem a ação de substâncias tóxicas, essas devem demandar maior presença de células regenerativas para manutenção da homeostase tecidual. Esta demanda maior pode estar relacionada à frequência maior destas células observadas nos resultados apresentados. Desta maneira, no processo regenerativo do epitélio do intestino médio em *T. vitticeps*, observou-se que as células regenerativas de maneira geral garantiram a produção de células do tipo digestiva a partir de processos de diferenciação celular. O que pode ser sustentado pelo aumento nas frequências das células digestivas no final do ciclo alimentar, ou seja, no período necessário para a digestão do sangue ingerido em uma refeição neste inseto.

A ausência de figuras de mitose não permite que se explique o aumento no número de células regenerativas observada durante a digestão nas diferentes regiões do intestino médio como processo resultante de proliferação de células tronco. Desta maneira, será necessário o emprego de um modelo experimental que, através de técnicas próprias para identificar as

células tronco, possa acompanhar de forma mais segura as variações nas frequências destes tipos celulares distribuídas nas diferentes regiões do intestino médio durante períodos distintos após repasto..

Somente as células endócrinas de todas as regiões do intestino médio, em ambos os sexos apresentam-se com frequências menores no final do ciclo alimentar em relação aos outros intervalos de tempo após repasto. Estes achados são coerentes com o observado em *L. migratoria*, cujas células regenerativas são capazes de gerar todos os tipos celulares que compõem o epitélio de revestimento do intestino médio, apesar de não ser possível comprovar a origem das células endócrinas a partir das células regenerativas (Illa-Bochaca & Montuenga, 2006). A dificuldade em se explicar a origem das células endócrinas a partir das células regenerativas foi justificada por Illa-Bochaca & Montuenga (2006) pelo tempo maior no ciclo de diferenciação para este tipo celular quando comparado com aquele gasto na formação das células digestivas. Assim, tal explicação possivelmente permitiria também compreender as diferenças nas frequências destes tipos celulares e das células regenerativas ao longo do ciclo alimentar observado em *T. vitticeps*.

## 5- CONCLUSÃO

Existe associação entre os processos digestivos e a frequência de células endócrinas positivas para FMRFamida, células digestivas e de células regenerativas no intestino médio de *T. vitticeps*, ocorrendo também diferenças no padrão de distribuição destas células entre machos e fêmeas e nas diferentes regiões do intestino médio. Tal associação relaciona-se a diversidade de funções que o FMRFamida exerce durante a digestão e em cada compartimento do intestino médio, além de refletir sua participação em outros processos metabólicos nas fêmeas. A associação entre células regenerativas e as variáveis aqui consideradas permanecem a ser mais bem explicadas.

## 6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise estrutural do intestino médio de *T. vitticeps* confirma achados anteriores, que descrevem o revestimento da parede deste órgão por um epitélio simples colunar, composto por três tipos básicos de células: as digestivas, as regenerativas e as endócrinas. Subjacente ao epitélio observa-se lâmina basal continua com camada muscular, que se divide em camada muscular circular interna e a longitudinal externa. Esta organização se assemelha ao observado em outros hemípteros, comprovando sua origem a partir de um ancestral comum.

O intestino médio apresenta-se dividido em três regiões: anterior, média e posterior cujos aspectos estruturais e funcionais diferem. Ao longo do processo de digestão, as células digestivas das diferentes regiões do intestino médio assumem aspecto estrutural diferente. Essas diferenças estruturais e ultra-estruturais encontradas, aliadas aos resultados obtidos com o emprego das diferentes técnicas de citoquímicas confirmaram o papel fisiológico diferenciado das regiões do intestino médio.

A presença de células endócrinas positivas para FMRFamida no intestino médio sofreu variações significativas em sua frequência conforme o sexo, a região do intestino médio e o tempo após repasto, comprovando que este peptídeo pode estar envolvidos em múltiplos eventos dos processos digestivos.

A digestão do sangue no hemíptero gera um custo devido ao dano celular ou tecidual promovido por resíduos produzidos durante o processo e que induzem a morte de células, identificadas pelo aspecto degenerativo. Quanto maior o efeito lesivo ou a perda de células digestivas promovida por fatores como a secreção enzimática, descrita por vários autores como sendo do tipo holócrina, maior a demanda do reparo tecidual realizado pelas células regenerativas, cujas frequências elevam-se no final do ciclo e que são também maiores nas fêmeas do que nos machos.

O modelo experimental aqui proposto foi suficiente para detectar os aspectos estruturais e ultraestruturais do intestino médio do *T. vitticeps* e sua relação com o tempo após repasto. Foi suficiente também para demonstrar o possível envolvimento de diferentes tipos de células endócrinas marcadas com FMRFamida em cada uma das regiões do intestino médio deste hemíptero, comprovando também que a frequência deste tipo celular é influenciada pelo sexo, pela região do intestino médio e tempo após

alimentação. No entanto, alguns pontos discutidos permanecem a ser mais bem explicados, como a diferença nas frequências dos tipos celulares do epitélio do intestino médio conforme o sexo e também, a variação na presença de células regenerativas durante o ciclo alimentar, que tende ao aumento no final da digestão do sangue. Estes pontos deverão ser posteriormente estudados a partir do uso de modelos experimentais mais adequados e que permitam a melhor compreensão dos processos relacionados a homeostasia do epitélio do intestino médio ao longo do ciclo alimentar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE-CUNHA JM, GONZALEZ MS, GARCIA ES, MELLO CB, AZAMBUJA P, ALMEIDA JC, DE SOUZA W, NOGUEIRA NF. Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. **Arthropod Struct Dev.**, 37: 337-346, 2008.
2. AN, Y., NAKAJIMA, T. & SUZUKI, K. Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. **Eur. J. Entomol.**, 95: 185-196, 1998.
3. ANDRADE-COELHO, C.A.; SANTOS-MALLET, J.; SOUZA, N.A.; LINS, U.; MEIRELLES, M.N.L.; RANGEL, E.F. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera:Psychodidae: Plebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96: 1141-1151, 2001.
4. ANDRIÈS, J. C. & TRAMU, G. Ultrastructural and immunohistochemical study of endocrine cells in the midgut of the cockroach *Blaberus craniifer* (Insecta, Dictyoptera). **Cell Tissue Res.**, 240: 323-332., 1985.
5. ANDRIÈS, J. C. & BEAUVILLAIN, J. C. Ultrastructural study of cholecystokinin-like immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut. **Cell Tissue Res.**, 254: 75-81, 1988,
6. AZAMBUJA, J.C.; GUIMARÃES, J.; GARCIA, E.S. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. **J. Insect Physiol.** 29: 833-37, 1983.
7. AZEVEDO, D.O.; NEVES, C.A., SANTOS-MALLET, J.R., GONÇALVES, T.C.; SERRÃO, J.E. Notes on midgut ultrastructure of the tropical bed bug *Cimex hemipterus* Fabricius (Hemiptera: Cimicidae). **J. Med. Ent.** no prelo.
8. AZUMA, M. & YAMASHITA, O. Cellular localization and proposed function of midguttrehalase in the silkworm larva, *Bombyx mori*. **Tissue & Cell**, 17: 539-551, 1985.
9. BARRETT, F.M. Absorption of fluid from the anterior midgut of *Rhodnius prolixus*. **J. Insect Physiol.**, 28: 335-341, 1982.
10. BAUTZ AM. A villin-like protein in the intestinal brush border of *Calliphora vicina* R.D. larvae (Diptera: Calliphoridae). **Int J Insect Morphol Embryol** 18: 281– 288, 1989.

11. BEDE, J. C., MCNEIL, J.N., TOBE, S.S. The role of neuropeptides in caterpillar nutritional ecology. **Peptides**, 28, 185-196. 2007.
12. BECHTOLD DA, LUCKMAN SM. The role of RFamide peptides in feeding. **J Endocrinol.**, 192: 3-15, 2007.
13. BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R.. Ultrastructural changes en posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae), **Curr J. Zool.**, 61: 2574-2586, 1983.
14. BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Cellular localisation of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during digestion, **Cell Tissue Res.**, 241: 421-28, 1985.
15. BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Acta Trop.**, 43(4):355-66, 1986a.
16. BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Nondigestive cell types in the midgut epithelium of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) **J. Med. Entomol.**, 23: 212-16,1986b.
17. BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Ultrastructural localisation of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Int. J. Insect Morphol. Embryol.** 17: 295-302, 1988.
18. BILLINGSLEY, P.F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v.35, p. 219-248, 1990.
19. BILLINGSLEY PF, LEHANE MJ. Structure and ultrastructure of the insects midgut. In **Biology of the Insects Midgut**. London: Chapman & Hall, p. 3-30, 1996.
20. BJERKNES M, CHENG H. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98:12497-502, 2001.
21. BONFANTI, P.; COLOMBO, A.; HEINTZELMAN, M.B.; MOOSEKER, M.S.; CAMATINI, M. The molecular architecture of an insect midgut brushborder cytoskeleton. **Eur J Cell Biol** 57: 298– 307, 1992.
22. BORGES, E.C., MACHADO, E.M., GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.**, 112: 130-133, 2006.
23. BRITTAN M, WRIGHT NA. Gastrointestinal stem cells. **J Pathol.**,197: 492-509, 2002.

24. BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. Plant proteinase-inhibitors - Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis-zea* and *Spodoptera-exiqua*. **J. Insect Physiol.**, 32: 827-833, 1986.
25. BROWN MR, LEA AO. FMRFamide- and adipokinetic hormone-like immunoreactivity in the nervous system of the mosquito, *Aedes aegypti*. **J Comp Neurol.**; 270: 606-14, 1988.
26. BURGOS, M.H. & GUTIERREZ, L.S. The intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the midgut. **J. Ultrastruct. Res.**, 57: 1-9, 1976.
27. CAMARGOS, E.R.S.; ROCHA, L.L.V.; RACHID, M.A.; ALMEIDA, A.P.; FERREIRA, A.J., TEIXEIRA-Jr, A.L.; CHIARI, E.; BARTON, M.; TEIXEIRA, M.M.; MACHADO, C.R.S. Protective role ET<sub>A</sub> endothelin receptors during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microb. Infect.**, 6: 650-656, 2004.
28. CHAPMAN R.F. (Ed.) **The insects – Structure and function**. Cambridge University Press, 1998, 770p.
29. CHENG, C; LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **Am. J. Anat.**, 141: 537, 1974.
30. COOK, B.J.; HOLMAN, G.M. Comparative pharmacological properties of muscle function in the foregut and hindgut of the cockroach, *Leucophaea maderae*. **Comp Biochem Physiol**, C61: 291–5, 1978.
31. COURA, J.R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Cienc. Cult.**,55: 30-33, 2003.
32. CRUZ-LANDIM, C. Ultraestrutura e função do tubo digestivo dos insetos. **ACIESP**. 6: 28-41, 1985.
33. CRUZ-LANDIM, C., SERRÃO, J.E., SILVA DE MORAES, R.L.M. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. **Cytobios**, 88, 95 – 104, 1996a.
34. CRUZ-LANDIM, C., SILVA DE MORAES, R.L.M., SERRÃO, J.E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **J. Comp. Biol.** 1, 29-40, 1996b.
35. DAMASCENO-SÁ, J.C.; SILVA, J.C. Evolução e aspectos do sistema digestório em Hemíptera. **Rev. Trop. – Ciênc. Agr. e Biol.**, 1: 32-40, 2007.
36. DALLAI, R, LUPETTI, P.; LANE, N.J. The organization of actin in the apical region of insect midgut cells after deep etching. **J Struct Biol** 122:283– 292, 1998.

37. DIAS, J.C.P.; FEITOSA, V.R.; FERRAS FILHO, A.; RODRIGUES, V.L.C.; ALENCAR, S.A.; SESSA, P.A. Fonte alimentar e potencial vetorial do *Triatoma vitticeps* com relação a doença de Chagas Humana no estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 84: 165-173, 1989.
38. DOW, J.A.T. Insect Midgut Function. **J. Insect Physiol**, 19:187-328, 1986.
39. DUVE, H.; THORPE, A.; SCOTT, A.; JOHNSEN, A.H.; REDFELD, J.F.; HINES, E. The sulfakinins of the blowfly *Calliphora vomitoria*, peptide isoaltion, gene cloning and expression studies. **Eur J Biochem**, 232:633-40, 1995.
40. ENDO, Y; NISHITSUTSUJI-UWO. J. Gut endocrine cells in insects: the ultrastructure of the gut endocrine cells of the lepidopterous species. **Biomed. Res.**, 2: 270-280, 1981
41. FIALHO, M.C.Q.; ZANUNCIO, J.C.; NEVES, C.A.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator: *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. **Ann. Ent. Soc. Amer.** 102: 119-127. 2009.
42. FARMER, J., MADDRELL, S.H., SPRING, J.H. Absorption of fluid by the midgut of *Rhodnius*. **J. Exp. Biol.**, 94: 310-316, 1981.
43. FERREIRA, C.; RIBEIRO, A.F.; GARCIA, E.S.; TERRA, W.R. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. **Insect Biochem.**, 18: 521- 530. 1988.
44. FLEMSTROM, G.M. & SJOBLUM, M. Epithelial cells and their neighbors. II. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** , 289: 377-380, 2005.
45. FUJITA, T.; KOBAYASHI, S. Structure and function of gut endocrine cells. **Int. Rev. Cytol. Suppl.**, 6: 187-233, 1977.
46. GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1909 (Hemiptera Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes, **Zootaxa**, 202: 1-36, 2003.
47. GEARY TG, MARKS NJ, MAULE AG, BOWMAN JW, ALEXANDER-BOWMAN SJ, DAY TA, LARSEN MJ, KUBIAK TM, DAVIS JP, THOMPSON DP. Pharmacology of FMRamide-related peptides in helminths. **Ann N Y Acad Sci.**, 897:212-27, 1999
48. GONÇALVES, I.R. Anatomia do tubo digestivo de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Bras. Ent .**, 29(2): 285-288, 1985.

49. GONÇALVES, T.C.M.; DE OLIVEIRA, E.; DIAS, L.S.A.; DE ALMEIDA, M.; NOGUEIRA, W.O.; DIAS, F.A.P. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 93:711-717, 1998.
50. GONÇALVES, T.C.M.; ROCHA, D.C.; CUNHA, R.A. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the state of Rio de Janeiro Brazil. **Rev Saúde Pub.**, 34: 384-52, 2000.
51. GOODCHILD, A. J. P. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. **Biol. Res.**, 41: 97 – 140, 1966.
52. GRILLO, L.A.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K.C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochem Mol Biol.**, 37(6):579-88, 2007.
53. GUEDES, B.A.M.; ZANUNCIO, J.C.; RAMALHO, F.S.. SERRÃO, J.E. Midgut morphology na enzymes of the obligate zoophytophagous stink bug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1963) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pan. Pac. Entomol.**, 83: 229-235, 2007.
54. HABIBI, J.; COUDRON, T.A.; BACKUS, E.A.; BRANDT, S.T.; WAGNER, R.M.; WRIGHT, M.K.; HUENSIG, J.E. Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 101: 159-171, 2008.
55. HALL P.; COATES, P.J.; ANSARI, B.; HOPWOOD, D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. **J Cell Sci**, 107:3565-3577, 1994.
56. HARSHINI, S.; NACHAMN, R.J.; SREECKUMAR, S. In vitro release of digestive enzymes by FMRFamide related neuropeptides and analogues in the lepidopteran insect *Opisina arenosella* (Walk.). **Peptides**, 23: 1759-1763, 2002.
57. HECKER H, FREYVOGEL T.A, BRIEGEL, STEIGER R. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. **Acta Trop.**, 28: 80-104, 1971.
58. HECKER H, BRUN R, REINHARDT C, BURRI PH. Morphometric analysis of the midgut of female *Aedes aegypti* (Insecta, Diptera) under various physiological conditions. **Cell Tiss Res.**, 152: 31-49, 1974.
59. HECKER, H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). **Cell Tiss Res.**, 184: 321-341, 1977.
60. HILL, S. R., ORCHARD, I. The influence of diet and feeding state on FMRFamide-related peptides in the gut of *Locusta migratoria* L. **Peptides**, 25:105-114, 2004.

61. HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Activities cycles and the control of four digestive proteinases in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **J. Insect Physiol.**, 29: 141-148, 1983.
62. HUANG, Y.; BROWN, M.R.; LEE, T.D.; CRIM, J.W. RFamide peptides isolated from the midgut of the corn earworm, *Helicoverpa zea*, resemble pancreatic polypeptide. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 28: 345-356, 1998.
63. ILLA –BOCHACA, I.; MONTUENGA, L.M. The regenerative niche of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. **J. Exp. Biol.**, 209: 2215-2223, 2006.
64. ISHIZUYA-OKA A. Regeneration of the amphibian intestinal epithelium under the control of stem cell niche. **Dev Growth Differ.**; 49: 99-107, 2007.
65. JARIAL, M.S. Electron Microscopic Study of the Anterior Midgut in *Cenocorixa bifida* Hung. (Hemiptera: Corixidae) with Reference to its Secretory Function. **Zoo. Science**, 32: 783-790, 2005.
66. KHALIFA A. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Parasitol.**, 40: 283-289, 1950.
67. KINGAN, T. G. Identification of neuropeptides in the midgut of parasitized insects: FLRFamides as candidate paracrines. **Mol Cell Endocrinol.**, 30;133: 19-32, 1997.
68. LANE, N.J. & HARRISON, J.B. An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. **J. Cell Sci.**, 39: 355– 372, 1979.
69. LANGE AB, ORCHARD I. The effects of SchistoFLRFamide on contractions of locust midgut. **Peptides** 19: 459-467, 1998.
70. LANGE, A.B. Feeding state influences the content of FMRFamide- and tachykinin-related peptides in endocrine-like cells of the midgut of *Locusta migratoria* **Peptides**, 22: 229–234. 2001.
71. LECHAGO, J. The endocrine cells of the tract digestive. General concepts and historic perspective. **Am. J. Surg. Pathol.**, 11: 63, 1987.
72. LEEDHAM, S. J.; BRITTAN, M.; MCDONALD, S. A. C.; WRIGHT, N. A. Intestinal stem cells. **J. Cell. Mol. Med.**, 9: 11-24, 2005.
73. LEHANE, M. J., MULLER, H. M. AND CRISANTI, A. (1996). Mechanisms controlling the synthesis and secretion of digestive enzymes in insects. In *Biology of the Insect Midgut* (ed. M. J. Lehane and P. F. Billingsley), pp. 195–205. London: Chapman & Hall.
74. LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu. Rev. Entomol.**, 42 525-550, 1997.

75. LENT, H.; WYGODZINSKY. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, vol. 163: article 3. New York, 1979.
76. LEWIN, K.J. The endocrine cell of the gastrointestinal tract: The normal endocrine cells and their hiperplasias. Part I. **Pathol. Annu.**, 21: 1, 1986.
77. LOROSA, E.S.; VALENTE, M.V.M.P.; CUNHA, V.; LENT, H.; JURBERG, J. Foco da Doença de Chagas em Arcádia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 98(7): 885-887, 2003.
78. LOROSA, E.S.; SANTOS C.M.; JURBERG, J. Foco de doença de Chagas em São Fidélis, no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 41(4):419-420, 2008.
79. MAESTRO, J.L.; AGUILAR, R.; PASCUAL, N.; VALERO, M.L.; PIULACHS, M. D.; ANDREU, D. Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. **Eur J Biochem**, 268:5824–30, 2001.
80. MARTIN, K.; POTTEN, C. S.; ROBERTS, S. A.; KIRKWOOD, T. B. L.. Altered stem cell regeneration in irradiated intestinal crypts of senescent Mice. **J. Cell Science** 111: 2297-2303, 1998.
81. MARTINS, G. F., NEVES, C.A., CAMPOS, L.A.O., SERRÃO, J.E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bess. **Micron**, 37, 161-168, 2006.
82. MERTE J, NICHOLS R. Drosophila melanogaster FMRFamide-containing peptides: redundant or diverse functions? **Peptides**, ;23: 209-20, 2002.
83. MIKSYS S, LANGE AB, ORCHARD I, WONG V. Localization and neurohemal release of FMRFamide-related peptides in the stick insect *Carausius morosus*. **Peptides**, 18:2 7-40, 1997.
84. MOFFETT, S.B. & MOFFET, D.F. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **J. Insect Science**, 5:20-32, 2005.
85. MORGAN, N.S.; HEINTZELMAN, M.B.; MOOSEKER, M.S. Characterization of myosin-IA and myosin-IB, two unconventional myosins associated with the *Drosophila* brush border cytoskeleton. **Devel Biol** 172: 51– 71, 1995.
86. NACHMAN, R.J.; HOLMAN, G.M.; COOK, B.J.; HADDON, W.F.; LING, N. Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. **Biochem Biophys Res Commun.**: 140:357–64, 1986a.

87. NACHMAN, R.J.; HOLMAN, G.M.; HADDON, W.F. Ling N. Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. **Science**: 234:71–3, 1986b.
88. NACHMAN, R.J.; GIARD, W.; FAVREL, P.; SURESH, T.; SREEKUMAR, S.; HOLMAN, G.M. Insect myosuppressins and sulfakinins stimulate release of the digestive enzyme amylase in two invertebrates: the scallop *Pecten maximus* and insect *Rhynchophorus ferrugineus*. In: Beckwith BE, Saria A, Chronwall BM, Sandman CA, Strand FL, editors. Neuropeptides in development and aging. **Ann NY Acad Sci**, 814:335–8, 1997.
89. NACHMAN, R.J. Invertebrate Neuropeptides VIII. Introduction. **Peptides**, 29:149-51, 2008
90. NATION, J.L.. Insect Physiology and Biochemistry. Florida. CRC Press LLC, 2002, 485p.
91. NEVES, C. A., BHERING, L.L., SERRÃO, J.E., GITIRANA, L.B. FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Micron** 33, 453-460, 2002.
92. NEVES, C.A.; GITIRANA, L.B.; SERRÃO, J.E. Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Braz. J. Biol.**, 63: 683-690, 2003.
93. OHLSTEIN, B.; SPRADLING, A. Multipotent Drosophila Intestinal Stem Cells Specify Daughter Cell Fates by Differential Notch Signaling. **Science**, 315: 988 – 992, 2007.
94. OKUDA K, CAROCI A, RIBOLLA P, MARINOTTI O, DE BIANCHI AG, BIJOVSKY AT. Morphological and enzymatic analyzes of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. **J. Insect Physiol.** Jul;51(7):769-76, 2005.
95. PENTILLA, A. Histochemical reactions of the enterochromaffin cells and the 5-hydroxytryptamine content of the mammalian duodenum. **Acta Physiol. Scand.**, 69:281, 1966.
96. PETERS, W. Peritrophic Membranes. Berlin: Springer Verlag, 1992.
97. POTTEN, C.S. & LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt. **Development**, 110: 1001-1020, 1990.
98. POTTEN, C.S.; WILSON, J.W.; BOOTH, C. Regulation and Significance of Apoptosis in the Stem Cells of the Gastrointestinal Epithelium. **Stem Cells**, 15:82-93, 1997.

99. POTTEN, C.S.; OWEN, G.; BOOTH, D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. **J. Cell Science**, 115: 2381-2388, 2002.
100. PRADHAN, S. The alimentary canal and pro-epithelial regeneration on in *Coccinella septempunctata* with a comparison of carnivorous and phytophagous. **Q. J. Microsc. Sci.** 81: 451-478, 1940.
101. PRICE, D. A.; GREENBERG, M. J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. **Science**, 197: 670-671, 1977.
102. PEARSE, A.G.E. Histochemistry: theoretical and applied, 3rd. Churchill Livingstone and Edinburgh, United Kingdom, 1972, 759p.
103. RAES, H.; VERBEKE, M. Light and electron microscopical study of two types of endocrines cell in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). **Tissue Cell**, 26: 223-230, 1994.
104. REGIS, L.; GOMES, Y.M.; FURTADO, F.A. Factors influencing male accessory gland activity and first mating in *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Sci. Applic.**, 6: 579-583, 1985.
105. REHFELD, JF. The New Biology of Gastrointestinal Hormones. **Physiol Rev.**, 78:1087-1108, 1998
106. REYNOLDS, ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol.** 17:208-12, 1963.
107. RIBEIRO, J.M.C.; PEREIRA, M.E.A. Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem.** 14: 103—8, 1984.
108. ROST-ROSZKOWSKA, M. M. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Achaeta domestica* (Orthoptera: Gryllidae) during degeneration and regeneration. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 101, 151-158, 2008.
109. RUDIN W., HECKER, H. Functional morphology of the midgut of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) during blood digestion. **Cell Tissue Res.**, 200: 193-203, 1979.
110. SANTOS C.D.; RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cell Tissue Res.**, 237: 565–574, 1984.
111. SANTOS, G.C.; ZUCOLOTO. S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arq. Gastroenterol.**, 33: 36-44, 1996.

112. SCHONHOFF, S.E.; MOLONEY, M.G., LEITER, A.B. Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells, **Endocrinol.**,145:2639–2644, 2004.
113. SCHOOF, L., VANDERBROECK, K. AND DELOOF, A. The myotropic peptides of *Locusta migratoria*. Structures, distribution, function and receptors. **Insect Biochem. molec. Biol.** 23: 859–881, 1993.
114. SEHNAL F, ZITNAN D. Midgut endocrine cells. In **Biology of the Insects Midgut**. London: Chapman & Hall, p. 55-85, 1996
115. SERRÃO, J.E., CRUZ-LANDIM, C. Gut structures in adult workers of necrophorous neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Entomol. Gener.** 19, 261-265, 1995.
116. SERRÃO, J. E., CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios.** 88, 161-171, 1996.
117. SERRÃO, J. E., CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of midgut endocrine cells in workers of stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Iheringia ser. Zool.** 81, 151-156, 1996.
118. SERRÃO, J.E., CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. **J. Apic. Res.** 39, 9-17, 2000.
119. SERRÃO, J.E., MARQUES-SILVA, S., MARTINS, G.F. The rectum of *Oxaea flavescens* (Andrenidae) has a specialized structure among bees. **Micron** 35, 245-253, 2004.
120. SEVALA V.L, SEVALA V.M., DAVEY K.G., LOUGHTON B.G. A FMRamide-like peptide is associated with the myotropic ovulation hormone in *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol.**, 20(3):193-203, 1992.
121. SEVALA, V.M.; SEVALA, V.L.; LOUGHTON, B.G. FMRamide-like activity in the female locust during vitellogenesis. **J Comp Neurol.**, ;337:286-94, 1993.
122. SILVA C.P, RIBEIRO A.F., GULBENKIAN S AND TERRA W.R. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. **J. Insect Physiol** 41: 1093– 1103, 1995.
123. SILVA, C. P.; SILVA, J. R.; VASCONCELOS, F. F.; PETRETSKI, M. D.A.; DAMATTA, R. A.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. **Arthropod Struc. Dev.**, 33:139-148, 2004.

124. SILVA, JR; GOMES-SILVA, L.; LINS, U.C.; NOGUEIRA, N.F.S.; DANSA-PETRETSKIA, M. Haemoxissome: A haem-iron containing structure in the *Rhodnius prolixus* midgut cells. **J. Ins. Physiol.**, 52: 542-550, 2006.
125. SHIBAHARA T, SATO N, WAGURI S *et al.* The fate of effete epithelial cells at the villus tip of the human small intestine. **Arch Histol Cytol**, 58:205-219, 1995.
126. SLORACH, E.M; CAMPBELL, C.F.; DORIN, J.R. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. **J. Cell Science**, 112 3029-3038, 1999.
127. STEFANINI, M, DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy. **Nature**, 216: 173-174, 1967.
128. TELLAM, R.L. in **Biology of the Insect Midgut: The Peritrophic Matrix** (Lehane, M. J., and Billingsley, P. F., eds) , pp. 86-108, Chapman & Hall, London,1996.
129. TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Braz. J.Med. Biol. Res**, 21: 675–734, 1988.
130. TERRA WR. Evolution of digestive system of insects. **Ann Rev Entomol**, 35: 181-200, 1990.
131. TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function (Review). **Comp. Bioch. and Phys.**,109: 1-62, 1994.
132. TERRA WR, COSTA RH, FERREIRA C. Plasma membranes from insect midgut cells. **An. Acad. Brás. Ciênc.**, 78:225- 269, 2006.
133. TETTAMANTI, G., GRIMALDI, A., CASARTELLI, M., AMBROSETTI, E., PONTI, B., CONGIU, T., FERRARESE, R., RIVAS-PENA, M.L., PENNACCHIO, F., EGUILEOR, M. Programmed cell death and stem cell differentiation re responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. **Cell Tiss. Res.**, 330: 345-359, 2007.
134. VEENSTRA JA, LAMBROU G. Isolation of a novel RFamide peptide from the midgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. **Biochem Biophys Res Commun.**, 213: 519-24, 1995.
135. VEENSTRA JA, LAU GW, AGRICOLA HJ, PETZEL DH. Immunohistological localization of regulatory peptides in the midgut of the female mosquito *Aedes aegypti*. **Histochem Cell Biol**,104: 337-47, 1995.
136. VEENSTRA JA. Isolation and identification of three RFamide-immunoreactive peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. **Peptides**, 20: 31-8, 1999.

137. WEI, Z.; BAGGERMAN, G.; NACHMAN, R. J.; GOLDSWORTHY, G.; VERHAERT, P.; De LOOF, A. Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J Insect Physiol**, 46:1259–65, 2000.
138. WIGCLESWORTH, V.B. The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. **Q. Jl microsc. Sci.** 73, 593—616, 1930.
139. WIGGLESWORTH, V. B. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Quart. J. Micr. Sci.**, 79:91-121, 1936.
140. WIGGLESWORTH, V.B. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. **Proc. R. Soc. Lond.**, 131: 313-339, 1943.
141. WIGGLESWORTH, V.B. Distribution of lipid in the lamellate endocuticle of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **J Cell Sci.**, 19(3):439-57, 1975.
142. ZITNAN, D., SAMAN, I. SEHNAL, F., Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. **Arch. Insect. Bioch. Physiol.**, 22: 113-132, 1993.
143. ZITNAN D, KINGAN TG, BECKAGE NE. Parasitism-induced accumulation of FMRamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of *Manduca sexta*. **Insect Biochem Mol Biol.**, 25: 669-78, 1995.
144. ZUDAIRE, E.; SIMPSON S.J.; MONTUENGA, L.M. Effects of food nutrient content, insect age and stage in the feeding cycle on the FMRamide immunoreactivity of diffuse endocrine cells in the Locust gut. **J. Exp. Biol.**, 201: 2971–2979 , 1998.