

**Ericson Kubrusly Gonçalves**



**ESTUDO MORFOFUNCIONAL DO SISTEMA  
DIGESTIVO DE *Haematopinus suis*  
(Linnaeus, 1758) (Phthiraptera, Anoplura)**

Tese de doutoramento apresentada  
ao Departamento de Biologia do  
Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo

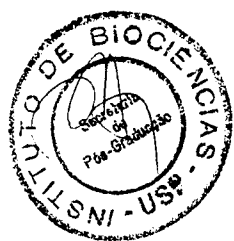


03480151

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro

São Paulo

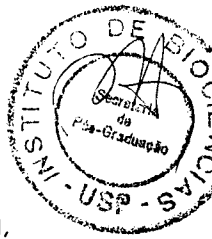
- 2002 -



## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ATA DA SESSÃO PÚBLICA PARA JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO CANDIDATO **ERICSON KUBRUSLY GONÇALVES**, DO PROGRAMA DE BIOLOGIA-GENÉTICA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS.

Aos vinte e quatro dias do mês de abril de dois mil e dois, às catorze horas, no Anfiteatro Acadêmico, Prédio da Administração, deste Instituto, reuniu-se a Comissão Julgadora, constituída nas formas e termos estabelecidos pelo Regimento Geral da Universidade de São Paulo, composta pelos Professores Doutores Alberto Augusto Gonçalves de Freitas Castro Ribeiro, Membro Nato, Sergio Antonio Vanin, do Departamento de Zoologia – IB/USP, Terezinha Tizu Sato Schumaker, do Departamento de Parasitologia – ICB/USP, Edna Freymüller Haapalainen, do Centro de Microscopia Eletrônica – EPM/UNIFESP, e Paulo Alexandre Abrahamsohn, do Departamento de Histologia e Embriologia – ICB/USP, para a defesa pública de Tese de Doutorado do candidato **ERICSON KUBRUSLY GONÇALVES**, do Programa de Biologia-Genética, intitulada: "**Estudo morfofuncional do sistema digestivo de *Haematopinus suis* (Linnaeus, 1758) (Phthiraptera, Anoplura)**". A sessão pública foi aberta pelo Prof. Dr. Alberto Augusto Gonçalves de Freitas Castro Ribeiro, na qualidade de Presidente, que após as formalidades de praxe passou a palavra ao candidato para uma breve apresentação de seu trabalho para a Comissão Julgadora e para o público presente. A seguir, passou a palavra à Profa. Dra. Edna Freymüller Haapalainen para início da arguição, e posteriormente aos Profs. Drs. Terezinha Tizu Sato Schumaker, Paulo Alexandre Abrahamsohn e Sergio Antonio Vanin, arguindo por último e fazendo as considerações finais sobre o trabalho, o próprio Presidente. Terminada a arguição, a Comissão Julgadora reuniu-se em sessão secreta para elaborar o relatório individual de seu trabalho de apreciação da Tese, decidindo, por unanimidade, de acordo com o que estabelece o Regimento Geral da Universidade de São Paulo, que o candidato foi



aprovado. A comissão julgadora considerou, ainda, que o texto defendido — está em condição de ser incorporado como tal ao banco de dados da Biblioteca Digital da USP. Encerrada a sessão secreta, o Prof. Dr. Alberto Augusto Gonçalves de Freitas Castro Ribeiro, Presidente da Comissão Julgadora proclamou o resultado do concurso. Nada havendo a tratar foi encerrada a sessão da qual eu, Helder Rossi Santos Souza, Técnico Acadêmico, da Seção de Pós-graduação, lavrei a presente ata que assino juntamente com a Comissão Julgadora. São Paulo, 24 de abril de 2002.

Prof. Dr. Alberto Augusto G. de F. Castro Ribeiro  
(Presidente)

Defesa homologada "ad-referendum"  
da CPG, em 25.10.02

NANUZA LUIZA DE MENEZES  
Comissão de Pós-Graduação  
Presidente

Prof. Dr. Sergio Antonio Vanin

Profa. Dra. Terezinha Tizu Sato Schumaker

Profa. Dra. Edna Freymüller Haapalainen

Prof. Dr. Paulo Alexandre Abrahamsohn

**À Lourdinha,  
minhas filhas  
e minha mãe**

## AGRADECIMENTOS

Esta página é dedicada a todos que, de alguma forma tornaram menos árdua a viabilização desta tese.

A cada um de vocês, meu sincero muito obrigado.

Ao Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, pela orientação, estímulo e amizade, durante a realização desta tese.

Ao Dr. Walter Terra, do Laboratório de Bioquímica de Insetos, IQ-USP, por ter disponibilizado seu laboratório e pelas sugestões sempre oportunas.

Agnaldo Veneroso  
Alcides Batista  
Alexandre Kerkis e esposa  
Andreia Lima  
Antonia da Dores Silva  
Deisy Santos de Moraes  
Prof. Dr. Geraldo Morgado Fagundes  
Prof. Gilberto Amorim Souto  
Hellen de Lima  
Prof. Hugo Henrique Mendez Garcia  
Dra. Kieiv Resende de Moura  
Prof. Dr. Marcelo Labruna  
Marcio Valentin Cruz  
Maria de Lourdes A. Feronha  
Murillo Pagnotta  
Profa. Dra. Neci Moraes  
Neide Sterza  
Profa. Rejane M. Cirra Scaff  
Prof. Dr. Roberto Cipullo  
Profa. Dra. Terezinha T. S. Schumaker  
Vera Lúcia Barboza  
Waldir Caldeira  
CAPES

## AGRADECIMENTOS

Esta página é dedicada a todos que, de alguma forma tornaram menos árdua a viabilização desta tese.

A cada um de vocês, meu sincero muito obrigado.

Ao Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, pela orientação, estímulo e amizade, durante a realização desta tese.

Ao Dr. Walter Terra, do Laboratório de Bioquímica de Insetos, IQ-USP, por ter disponibilizado seu laboratório e pelas sugestões sempre oportunas.

Agnaldo Veneroso  
Alcides Batista  
Alexandre Kerkis e esposa  
Andreia Lima  
Antonia da Dores Silva  
Dr. Roberto Cipullo  
Deisy Santos de Moraes  
Hellen de Lima  
Prof. Hugo Henrique Mendez Garcia  
Dra. Kiev Resende de Moura  
Prof. Dr. Marcelo Labruna  
Marcio Valentin Cruz  
Maria de Lourdes A. Feronha  
Murillo Pagnotta  
Profa. Dra. Neci Moraes  
Neide Sterza  
Profa. Rejane M. Cirra Scaff  
Prof. Gilberto Amorin Souto  
Profa. Dra. Terezinha T. S. Schumaker  
Vera Lúcia Barboza  
Waldir Caldeira  
CAPES

# SUMÁRIO

Dedicatória .....	i
Agradecimentos .....	ii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
I. MATERIAL .....	11
II. MÉTODOS .....	11
1 - ANATOMIA E HISTOLOGIA .....	11
1.1 - FIXAÇÃO .....	11
a - Solução Fixadora segundo Zamboni .....	12
b - Solução Fixadora segundo Junqueira .....	12
c - Solução Fixadora segundo Bouin .....	13
1.2 - SELEÇÃO DO INSTRUMENTAL DE DISSECÇÃO .....	13
1.3 - DISSECÇÃO .....	14
1.4 - DESIDRATAÇÃO .....	14
1.5 - DIAFANIZAÇÃO .....	15
1.6 - INCLUSÃO .....	15
1.7 - MICROTOMIA .....	16
1.8 - COLORAÇÃO .....	16
2 - MICROSCOPIA CONFOCAL .....	17
3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	18
3.1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	18
3.2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	18
4 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	20
4.1 - Preparo das amostras .....	20
4.2 - Ensaio enzimáticos .....	21
4.3 - Determinação de proteínas .....	22
4.4 - Resolução cromatográfica das enzimas digestivas .....	22
<b>RESULTADOS</b> .....	23
3.1 - ANATOMIA .....	24
3.2 - MICROSCOPIA DE LUZ .....	25
3.2.1 - Padronização da metodologia .....	25

3.2.2 - Glândula salivar .....	26
3.2.3 - Tubo digestivo .....	27
3.3 - MICROSCOPIA CONFOCAL .....	31
3.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	31
3.5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	32
3.6 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	37
3.6.1 – Determinação de atividade enzimática em <i>H. suis</i> .....	37
Tabela 1 .....	37
3.6.2 – Resolução das atividades enzimáticas intestinais .....	38
<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>RESUMO</b> .....	58
<b>ABSTRACT</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>FIGURAS</b> .....	74



## **INTRODUÇÃO**

O sistema digestivo dos insetos apresenta uma notável diversidade morfológica e funcional, que advém do fato de que esses animais habitam nosso planeta desde o período Devoniano e que, sob a ação contínua da evolução, vieram sofrendo pressões seletivas de adaptação ao ambiente, desde que surgiram há 400 milhões de anos. Levando em consideração que 3/4 das espécies animais conhecidas são insetos (ROSS et al., 1982), a adaptação de tantas espécies ao ambiente levou-as a aproveitarem, como alimento, uma gama imensa de produtos que pudessem ser digeridos. Assim, quase todo material orgânico que encontramos hoje na natureza pode ser utilizado como alimento pelos insetos (WIGGLESWORTH, 1972). Isso cria uma vasta opção de dietas, que podem ser analisadas do ponto de vista das suas características mecânicas (se sólidas ou líquidas), ou da composição nutricional (se são de origem animal ou vegetal) (RIBEIRO et al., 1990).

A adaptação a cada tipo de dieta levou à seleção de peças bucais que foram se especializando para melhor se adequarem à função, o que resultou em um grande número de especializações envolvidas no processo de captação do alimento. Por conseguinte, a grande diversidade alimentar fez com que o sistema digestivo desenvolvesse peculiaridades morfológicas e funcionais adaptadas a uma melhor digestão e assimilação do tipo de alimento ingerido.

Do ponto de vista anatômico, o sistema digestivo dos insetos é dividido em 3 regiões principais: o intestino anterior ou estomodeo, o intestino médio, ventrículo ou mesêntero, e o intestino posterior ou proctódeo (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1985; TERRA, 1990). O intestino anterior começa na boca, e inclui a cavidade bucal, a faringe, o esôfago, o proventrículo e o papo. O papo é um órgão de estocagem em muitos insetos e também serve como um local para digestão em outros. O intestino anterior é revestido por cutícula e, em alguns insetos, é reduzido, limitando-se a um tubo estreito. O proventrículo é um órgão triturador em alguns insetos e, na maioria, forma uma válvula,

controlando a passagem do alimento para o intestino médio. O intestino médio (ventrículo) é a região do tubo digestivo onde ocorrem os principais eventos da digestão e a absorção de nutrientes. Inclui um tubo simples, do qual podem se originar sacos em fundo cego, denominados cecos gástricos. Na maioria dos insetos, o intestino médio apresenta uma membrana acelular (membrana peritrófica), que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (no interior da membrana) e o espaço ectoperitrófico (entre a membrana e o epitélio). Na região do esfíncter (piloro), que separa o intestino médio do intestino posterior, inserem-se os túbulos de Malpighi que são órgãos de excreção. O intestino posterior inclui o íleo, colo e reto, este último envolvido na absorção de água e íons, terminando no ânus. O intestino posterior é revestido por cutícula e, ao menos em alguns insetos, limita-se a um tubo estreito, enquanto que em outros, está modificado em uma câmara de fermentação ou pança, que abriga microrganismos envolvidos na digestão de celulose.

O epitélio do intestino médio é sempre simples e é constituído por um tipo principal de célula, usualmente denominada célula colunar. Células regenerativas, pouco diferenciadas e comprometidas com a reposição do epitélio, e células endócrinas, são, também freqüentemente observadas (CHAPMAN, 1985; TERRA, 1990). A célula colunar responde pelos eventos mais significativos do processo digestivo em insetos, estando envolvida na absorção de nutrientes e água, na secreção de água e enzimas digestivas e na digestão final, através de enzimas ligadas à membrana das microvilosidades.

Os principais eventos do processo digestivo ocorrem em três fases distintas: a digestão inicial, a intermediária e a final. A fase inicial da digestão consiste em diminuir o peso molecular das moléculas de alimento, através da ação de hidrolases poliméricas, tais como amilase, celulase, hemicelulase e tripsina. A digestão intermediária é a hidrólise, por hidrolases oligoméricas (exemplificadas pelas aminopeptidases), de

moléculas oligoméricas de alimento, para dímeros e/ou pequenos oligômeros, os quais são reduzidos, durante a digestão final, para monômeros, por hidrolases diméricas (RIBEIRO, et al., 1990; TERRA, 1990; SCHUMAKER et al., 1993).

A primeira tentativa de relacionar os compartimentos do intestino médio com cada uma das três fases da digestão, foi feita em larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Nematocera). Determinações enzimáticas feitas em células do intestino médio e no espaço endoperitrófico e ectoperitrófico de larva de *R. americana*, levou à proposição de que a digestão inicial ocorra no espaço endoperitrófico, enquanto que a digestão intermediária e a final ocorram, respectivamente, no espaço ectoperitrófico e ao nível das células do intestino médio (FERREIRA et al., 1981). Análises morfo-bioquímicas levaram os autores a concluir que as células da região posterior do ventrículo secretam água, enquanto as dos cecos, absorvem. Isso cria uma corrente póstero-anterior de água, no espaço ectoperitrófico. Assim, o alimento que chega ao intestino médio, via espaço endoperitrófico, é hidrolisado por enzimas digestivas enquanto é levado em direção à região central. Quando a redução de seu peso molecular permite, o alimento passa através da membrana peritrófica, entrando no espaço ectoperitrófico. Ao ser levado de volta à região anterior, passa pela digestão intermediária e final, sendo absorvido pelas células que revestem o ceco. As enzimas liberadas durante a absorção, voltam para o espaço endoperitrófico, iniciando novo ciclo digestivo. Isso leva a uma economia de enzimas, já que as mesmas podem ser reutilizadas várias vezes. Esse modelo de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas foi confirmado em insetos de outras ordens, com diferentes hábitos alimentares e naqueles que não possuem cecos. Neste último caso, o epitélio da região anterior do intestino médio responde pela absorção (ver revisões em: TERRA, 1988; RIBEIRO et al., 1990; TERRA, 1990).

Outro modelo de digestão em insetos ocorre em espécies das ordens Hemiptera e Thysanoptera, as quais não possuem membrana peritrófica (SILVA et al., 1996; TERRA, 2001). Nesses animais, as microvilosidades da face apical das células do intestino médio são recobertas por uma segunda membrana lipo-protéica (LANE & HARRISON, 1979), denominada membrana perimicrovilar. Esta membrana recobre as microvilosidades a uma distância constante e, na extremidade das microvilosidades, a membrana perimicrovilar se projeta para a luz do IM, onde forma um compartimento fechado, denominado espaço perimicrovilar (SILVA et al., 1996; TERRA, 1996).

O detalhamento dos modelos propostos para a digestão entre os insetos necessita de subsídios que incluam, principalmente, o estudo físico-químico das enzimas envolvidas na digestão, sua distribuição espacial no sistema digestivo e o estudo dos processos secretores que ocorrem na célula. A fisiologia da digestão nos insetos é pouco conhecida, principalmente porque raros são os trabalhos que determinam a distribuição das enzimas digestivas nos vários compartimentos dos seus tubos digestivos, assim como poucos são os estudos que procuram relacionar a fisiologia com a morfologia (CHAPMAN, 1985; APPLEBAUM, 1985; RIBEIRO et al., 1990; TERRA, 1990; TERRA & FERREIRA, 1994; RIBEIRO et al., 1996). Sem esses dados não ficam esclarecidos os passos pelos quais o alimento é hidrolisado nos diversos sítios do canal alimentar e, finalmente, absorvido.

Dentro desse contexto, um estudo detalhado de representantes da ordem Phthiraptera, filogeneticamente próxima dos Hemiptera e praticamente desconhecida do ponto de vista morfo-fisiológico, teria um grande interesse para o conhecimento das tendências evolutivas existentes nos insetos.

A ordem Phthiraptera é constituída por insetos ectoparasitas de aves e mamíferos, conhecidas popularmente como piolhos. Estão distribuídos em quatro sub-ordens: Amblycera, Ischnocera, Rhyncophthirina e Anoplura (LYAL, 1985; SMITH, 2001).

As sub-ordens Amblycera e Ischnocera são constituídas por cerca de 3.000 espécies conhecidas (PAGE, 1994; SMITH, 2001). Na literatura mais antiga, ainda encontramos referências a estas duas sub-ordens como pertencentes à ordem Malophaga, mas desde que LYAL (1985) apontou objeções à essa classificação, uma nova posição cladística tem sido aceita, incorporando-as à ordem Phthiraptera. Os insetos dessas duas sub-ordens têm, em comum, o fato de suas peças bucais serem adaptadas para mastigar. Devido a essa característica, os insetos dessas sub-ordens são designados piolhos mastigadores. Da mesma forma, vários livros fazem referência a eles como "piolhos de aves". Isso deve-se ao fato de que os primeiros piolhos mastigadores foram estudados em aves. Mas por sua imprecisão, o termo "piolhos de aves" está em desuso (CHENG, 1986), já que várias espécies que gradualmente foram sendo descobertas têm como hospedeiros, os mamíferos. Atualmente sabemos que são encontrados parasitando quase todos os animais, desde os maiores mamíferos até os menores pássaros e, demonstrando grande capacidade adaptativa, têm como hospedeiros, também, animais marinhos, como focas e leões marinhos. Conforme a espécie observada, esses piolhos se alimentam de células ou penas da epiderme do hospedeiro.

A sub-ordem Rhyncophthirina compreende uma única espécie, que parasita elefantes e porcos selvagens da África. É um pequeno piolho que possui mandíbulas na extremidade de um longo focinho semelhante a uma probóscide.

A sub-ordem Anoplura é representada por mais ou menos 500 espécies de piolhos (PAGE et al., 1995), cujo aparelho bucal é do tipo perfurante, alimentando-se do sangue sugado após punção. São por isso denominados "piolhos sugadores". Todos têm como hospedeiros, os mamíferos.

Dentre todas as espécies de Anoplura, a mais conhecida e estudada é a *Pediculus humanus*, por razões claramente ligadas à saúde pública. Esse parasita habita a cabeça e o corpo do homem e, por muito tempo, acreditou-se que se tratava de 2 espécies diferentes. Mas, atualmente, um crescente número de pesquisadores consideram que se trata de apenas uma (CHENG, 1986). São transmissores de várias doenças como tifo (NIANG et al., 1999; RAOULT et al., 1999), febre da trincheira (DRANCOURT, 1999; RYDKINA et al., 1999), endocardite bacilar angiomatosa (JOURDAIN et al., 1998; BROUQUI et al., 1999), febre recorrente (DRANCOURT, 1999; RAOULT et al., 1999), e tularemia (CHENG, 1986). Outra espécie de Anoplura que também tem como hospedeiro a espécie humana, é o *Phthirus pubis*, que habita a área genital e perianal.

O objeto de estudo do presente trabalho é uma espécie da ordem Phthiraptera, sub-ordem Anoplura, família Haematopinidae, gênero Haematopinus, espécie *Haematopinus suis* (LYAL, 1985; DURDEN & MUSSER, 1994; PAGE, 1994; PAGE & PRICE, 1995). Este inseto é um ectoparasita do porco doméstico, alimentando-se várias vezes ao dia, através de perfurações na pele do hospedeiro e conseqüente sucção de seu sangue (OCHANDA et al., 1996). Não possui olhos, mas tem preferência por locais no hospedeiro que não estejam sujeitos à luz intensa e cuja temperatura oscile ao redor dos 30°C. Esse parasita, vulgarmente denominado "piolho do porco", apresenta, nos machos, um comprimento de cerca de 4 mm e nas fêmeas, 6 mm. Sua cabeça apresenta um aspecto pontiagudo na região anterior, sendo dotada de uma peça bucal perfurante constituída por 3 estiletos. Um deles é oco, recebendo na extremidade posterior, a saliva produzida pela glândula

salivar e a conduzindo até o local onde será inoculada no hospedeiro. Assim como a cabeça, o tórax não apresenta diferenças morfológicas entre machos e fêmeas. Dali partem três pares de pernas que terminam em pinças aptas a se prenderem aos pêlos do hospedeiro. Após o tórax, o corpo do animal expande-se para formar o abdômen, que se apresenta achatado dorso-ventralmente. No sentido ântero-posterior, possui um formato arredondado nos machos e mais alongado nas fêmeas.

O *H. suis*, além de parasitar o porco, onde atua como um vetor de transmissão de febre suína, também se alimenta de sangue humano, se as condições assim o permitirem (CHENG, 1986). É um animal, portanto, capaz de parasitar mais de um hospedeiro.

O estudo do *H. suis* tem especial relevância, pelo fato desse ectoparasita ter, como hospedeiro, um animal de reconhecida importância agropecuária, onde atua como fator irritante (ROBERTS, 1965; DAVIS & WILLIAMS, 1986; LEVOT, 2000). Isso repercute em deficiência no ganho de peso e diminuição na produção de leite, prejudicando o crescimento das novas gerações do rebanho suíno. Portanto, o *H. suis* tem uma indiscutível conotação econômica. A importância em se trabalhar com essa espécie se estende à área sanitária, pois esse inseto é reconhecidamente um transmissor da febre suína. Tem sido controlado pelos médios e grandes criadores de suínos, através da utilização de inseticidas, mas ainda é grande a sua presença em pequenas propriedades rurais.

Considerando a ausência de estudos sobre a morfofisiologia funcional do tubo digestivo do *H. suis* na literatura, o presente trabalho busca fornecer informações que possam ser utilizadas na melhoria do conhecimento acerca da morfo-fisiologia digestiva dessa espécie e sua inserção no panorama evolutivo dos insetos. Esse conhecimento poderá contribuir para o controle biológico do parasita, através, por exemplo, do uso de inibidores específicos de enzimas digestivas.



Dentro deste contexto, os objetivos que nos propomos atingir são:

- Estudar, detalhadamente, o sistema digestivo do *H. suis* do ponto de vista anatômico, histológico e da sua ultra-estrutura, procurando identificar possíveis diferenças morfológicas ao longo do epitélio digestivo e verificar a presença de membrana peritrófica ou perimicrovilar.
- Identificar as principais enzimas digestivas atuantes no processo da digestão.
- À luz das informações levantadas acerca da organização da digestão em um representante dos Phthiraptera, grupo praticamente inexplorado neste aspecto, contribuir para o estabelecimento de um esquema evolutivo abrangente para o processo digestivo dos insetos, objetivo maior do grupo de pesquisa onde se insere este trabalho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **I – MATERIAL**

Foram estudados exemplares machos, adultos de *Haematopinus suis* (Linnaeus, 1758) (Phthiraptera, Haematopinidae) (**Fig. 1-A, B**) coletados em porcos adultos, criados na pocilga da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, campus de Pirassununga, SP.

## **II - MÉTODOS**

### **2.1 - ANATOMIA E HISTOLOGIA**

#### **2.1.1 - Fixação**

Ainda no local da coleta, no campus de Pirassununga, metade dos lotes de animais foram imediatamente fixados, após remoção de parte da região muscular lateral do abdômen, para permitir a rápida penetração dos fixadores. O restante dos lotes de animais foi mantido vivo, e em jejum, por um período de 8 horas, e só então fixado no laboratório.

Com a finalidade de determinar qual solução fixadora traria os melhores resultados na preservação das estruturas teciduais, foram testadas as seguintes soluções:

a - Solução fixadora segundo Zamboni:

Para obtermos a solução fixadora segundo ZAMBONI (STEFANINI et al., 1967), foi preparado, inicialmente, o tampão fosfato Sorensen (TPS) a 0,2M. Para isso, foi feita uma solução que denominamos solução A, diluindo 15,6g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 500ml de água destilada. Em seguida, preparamos a solução B, diluindo 14,2g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 500ml de água destilada. Após, misturamos 140ml da solução A com 360ml da solução B, o que resultou em 500ml da solução final do tampão a 0,2M, pH 7,2. Preparamos, a seguir, uma solução de paraformaldeído a 4% em água destilada, a qual misturamos em partes iguais com TPS a 0,2M. Disso resultou uma solução de paraformaldeído a 2% em TPS 0,1M. Para a solução fixadora final, misturamos 850ml da solução de paraformaldeído a 2%, com 150ml de uma solução saturada de ácido pícrico.

b - Solução fixadora segundo Junqueira:

Para o preparo da solução fixadora segundo JUNQUEIRA et al. (1989), misturamos em 450ml de água destilada, 4,5g de NaCl e 20g de paraformaldeído. Adicionamos então, 50ml de solução tampão fosfato (PBS) 0,1M e corrigimos o pH para 7,0. O PBS foi obtido misturando 90ml de solução de 13,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 100ml de água destilada, em uma solução de 89,5g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  em 250ml de água destilada. O pH foi corrigido para 7,0.

### c - Solução fixadora segundo Bouin:

A solução fixadora segundo Bouin (BEÇAK & PAULETE, 1976), foi obtida, através da mistura de 75ml de solução saturada de ácido pícrico, com 25ml de formalina e 5ml de ácido acético.

Foram utilizados 120 animais, distribuídos em lotes de 20 para cada grupo, conforme especificado abaixo. Repetimos o experimento 30 dias após, a título de confirmação de dados, tendo sido utilizado um total de 240 animais. O tempo de fixação foi de 6 horas a 4°C para aqueles fixados com a solução de Junqueira e Zamboni e 6 horas em temperatura ambiente, para os fixados com a solução de Bouin. O material fixado com a solução de Zamboni, foi lavado em PBS. Após, todo o material foi colocado, devidamente identificado, em álcool 70%. Dessa maneira, obtivemos os seguintes grupos de animais fixados:

- 1° grupo: animais em jejum e fixados com Zamboni
- 2° grupo: animais alimentados e fixados com Zamboni.
- 3° grupo: animais em jejum, fixados segundo Junqueira.
- 4° grupo: alimentados, fixados segundo Junqueira.
- 5° grupo: em jejum, fixados com líquido de Bouin.
- 6° grupo: alimentados, fixados com líquido de Bouin.

#### **2.1.2 - Seleção do instrumental de dissecação**

A dissecação do tubo digestivo de um animal com as reduzidas dimensões do *H. suis*, foi um trabalho que consumiu meses de tentativas e aprimoramento de técnicas. Inicialmente, optamos pelo uso de instrumental cirúrgico utilizado em oftalmologia, que, após muitos insucessos, nos forçou à criação de instrumentos mais adequados à dissecação desses pequenos animais (**Fig. 1-C**).

### **2.1.3 - Dissecção**

Após várias tentativas, optamos pela seguinte técnica de dissecção. Cada exemplar de *H. suis* era retirado da solução fixadora e colocado sobre uma lâmina de vidro para microscopia de luz, onde havia sido colada uma fita adesiva dupla face. Sobre o animal era colocada uma gota do fixador, a fim de se evitar um prejudicial ressecamento dos tecidos. Com a lâmina de vidro colocada em um microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 2000C, era feita a remoção da carapaça dorsal, sob luz de fonte de fibra óptica. A seguir, os tecidos internos dos animais eram cuidadosamente liberados das partes laterais e ventral do exoesqueleto.

Os animais para estudo em microscopia de luz, foram dissecados de forma a ter removidas apenas a sua carapaça de quitina e parte da musculatura, evitando-se assim traumas mecânicos desnecessários que decorreriam de uma excessiva manipulação, caso tentássemos dissecar totalmente o intestino. Para estudo da anatomia, os tubos digestivos foram completamente liberados das estruturas adjacentes. Após esse estágio do processamento, o material destinado ao estudo anatômico, foi fotografado através de microscópio estereoscópico, e aquele destinado à microscopia de luz, seguiu então, o processamento de rotina.

### **2.1.4 - Desidratação**

As peças destinadas ao exame sob microscopia de luz, foram desidratadas em série crescente de etanol, da seguinte maneira: as que se destinavam à inclusão em parafina, foram totalmente desidratadas através de banhos sucessivos de 2 horas cada, em álcool etílico 70%, 80%, 95% e 2 banhos finais em álcool 100%; aquelas para inclusão em historesina, passaram por uma desidratação parcial, chegando até álcool 95%, conforme instruções do fabricante.

### **2.1.5 - Diafanização**

Ao serem removidas do etanol, as peças de tecido para inclusão em parafina, foram submetidas a 2 banhos de xilol, de 2 horas cada.

### **2.1.6 - Inclusão**

O material destinado à inclusão em parafina, passou por 2 banhos de embebição em parafina marca Merck, ponto de fusão 56-58°C, em estufa a 58°C, com duração de 2 horas cada um e finalmente emblocados.

Para inclusão em historesina (hidroximetilmetacrilato) foi utilizado um kit de inclusão da Leica, que é constituído por três componentes: a resina básica, o ativador e o endurecedor. Seguimos as recomendações do fabricante, respeitando o volume adequado ao material que seria emblocado.

Preparamos a historesina misturando 50ml de resina básica com 0,5ml de ativador. Disso resultou a solução de infiltração. Após, misturamos 5ml dessa solução com 5ml de álcool etílico 95% e deixamos os tubos digestivos girando dentro dela por 1 hora. A seguir, colocamos o material em solução de infiltração pura, onde ficou girando por 1 hora. Repetimos esse passo, utilizando nova quantidade de resina pura.

Para a emblocagem, misturamos 15ml da solução de infiltração com 1ml do líquido endurecedor e deixamos o material imerso na historesina, utilizando formas adequadas para essa finalidade, em local com desumidificador de ambiente, por 24 horas.

### **2.1.7 - Microtomia**

Os blocos de parafina foram cortados com navalha de aço inoxidável, em um micrótomo marca Reichert-Jung modelo 820-II, de forma a obter secções longitudinais com 5 $\mu$ m de espessura, da região intestinal de cada grupo. A seguir eram esticados sobre uma solução de gelatina e água a 45°C, retirados com uma lâmina histológica e postos para secar em estufa a 37°C.

Os blocos de historesina foram cortados utilizando navalha descartável de tungstênio, num micrótomo marca Leica modelo RM2145, regulado para fornecer cortes de 3 $\mu$ m de espessura. Cada corte, assim obtido, era esticado em uma gota de água destilada sobre lâmina de vidro e postos para secar em placa quente.

### **2.1.8 - Coloração**

Após secas em estufa, as lâminas com cortes em parafina, correspondentes a cada grupo citado na fixação, passaram por 2 banhos em xilol e hidratação em série decrescente de álcoois e água destilada.

Nesse ponto, tanto as lâminas contendo os cortes de tubo digestivo emblocados em parafina, quanto aqueles em historesina, foram coradas com Hematoxilina-Eosina. Após coloração, foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Carl Zeiss-Jena modelo JenaVal.

As lâminas com cortes de glândula salivar, foram coradas com a solução corante segundo SATO & SHAMOTO (1973), obtida a partir da mistura de 0,5g de fosfato de sódio monobásico, com 0,25g de fucsina básica, 0,7g de azul de metileno, 15ml de ácido bórico 0,5%, 10ml de água destilada e 10ml de NaOH 0,72% pH 6,8. A coloração mais adequada para os cortes de glândula salivar, foi obtida com o tempo de 10 segundos a 20°C.



Esta solução corante, foi originalmente indicada para cortes semi-finos de microscopia eletrônica de transmissão. Tendo apresentado ótimos resultados em células que possuíam grânulos de secreção, adotamos essa solução para glândula salivar.

## **2.2 - MICROSCOPIA CONFOCAL**

Para a visualização de quitina por fluorescência, com a finalidade de detectar a presença de membrana peritrófica, os tubos digestivos foram fixados por 6 horas a 4°C, em solução fixadora segundo Zamboni (STEFANINI et al., 1967). Foram, a seguir, lavados em tampão fosfato de sódio 0,2M, incluídos em parafina e submetidos à microtomia, para obtenção de cortes com 14µm de espessura. Após desparafinização em xilol e hidratação em série decrescente de etanol, foram lavados em PBS ("phosphate buffer saline"). Passaram então por outra lavagem, agora em PBS contendo 0,2% de Triton X100. A seguir, preparamos uma solução de PBS, com N-acetilglicosamina 0,2M, e WGA-FITC ("wheat germ agglutinin-fluorescein isothiocyanate") onde incubamos os cortes, em câmara úmida e ao abrigo da luz, por 12 horas a 4°C. A ligação de WGA com quitina é específica em presença de excesso de N-acetilglicosamina (PETERS & LATKA, 1986). Após a incubação, o material foi submetido a 3 lavagens de 5 minutos cada, em PBS, em temperatura ambiente.

A montagem das preparações foi feita com a utilização de VectaShield, que reduz a perda de fluorescência das preparações. Para o estudo dos cortes, utilizamos um microscópio confocal Zeiss modelo LSM-410.

## **2.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

### **2.3.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura**

Inicialmente o material foi fixado em solução de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 , a 4°C, por 1 hora e lavado em 3 banhos de 5 minutos em água destilada. A seguir, passou por um banho de 30 minutos em ósmio 1%, outro em ácido tânico 1% por 10 minutos e novamente em ósmio 1% por 30 minutos. Foi então lavado 3 vezes em água destilada por 5 minutos, desidratado em série crescente de álcool etílico, seco em unidade de ponto crítico de CO<sub>2</sub> da Balzers, modelo CPD-030. Finalmente, as preparações foram montadas em "stubs" adequados, metalizados em metalizador Balzers, modelo SCD-050 e examinadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM-940.

### **2.3.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para microscopia eletrônica de transmissão, foram testadas algumas soluções fixadoras, partindo da técnica básica descrita por LANE et al., (1972), com modificações (comentário na primeira página da Discussão).

Solução fixadora 1: glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M e lavagem em tampão cacodilato 0,1M com sacarose 0,2M.

Solução fixadora 2: glutaraldeído 3%, em tampão cacodilato 0,1M com sacarose 0,1M e lavagem no mesmo tampão anterior.

Solução fixadora 3: glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M com sacarose 0,2M e lavagem em tampão cacodilato 0,1M com sacarose 0,4M.

Além dessas três, foi também testada uma quarta solução fixadora, descrita por KARNOVSKY (1965) com modificações: misturamos 10ml de tampão cacodilato 0,2M, com 2ml de glutaraldeído 25%, 4ml de paraformaldeído 10%, 20ml de água destilada e 10mg de cloreto de cálcio. O tampão de lavagem, cacodilato de sódio 0,2M pH 7,4, foi preparado, misturando 4,28g de  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , com 100ml de água destilada.

Para todos os fixadores, o tempo de fixação foi de 2 h a 4°C, seguido de 3 lavagens de 10 minutos cada, no tampão a 4°C.

Após a fixação, submetemos o material a uma pós-fixação, permanecendo por 1 h a 4°C, em uma solução de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M. Em seguida, foram lavados em 3 banhos de 10 minutos a 4°C em uma solução de NaCl 0,1M, passando então pelo processo "en bloc staining", que consiste em submeter o material a um banho em acetato de uranila 1% aquosa, por 40 minutos a 4°C. Depois, os tubos digestivos foram desidratados em série crescente de etanol, embebidos e emblocados em resina de SPURR (1969), segundo orientações do fabricante e colocados em estufa a 65°C.

Uma vez atingido seu endurecimento, os blocos foram cortados, sempre com navalha de vidro, em ultramicrótomo Leica modelo Ultratome Nova. Os cortes ultrafinos foram então contrastados por 10 minutos em uma solução de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss modelo EM 900.

## 2.4 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Exemplares vivos, adultos de *H. suis*, foram colocados sobre lâminas histológicas contendo fita adesiva de dupla face e dissecados, após imobilização pelo frio, em solução de NaCl 0,1M a 4°C, sob microscópio estereoscópico. Os tubos digestivos foram removidos com o auxílio de instrumental apropriado e mantidos sob gelo.

### 2.4.1 – Preparo das amostras

Os tubos digestivos de *H. suis* foram homogeneizados em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem em água bidestilada gelada. O material resultante foi filtrado em malha de nylon de 100  $\mu\text{m}$  e o volume ajustado em balão volumétrico.

A seguir o material foi centrifugado a 14.000rpm (15.150 x g), durante 30 minutos, em centrífuga Sorvall RMC 14, na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o volume ajustado em balão volumétrico (sobrenadante  $S_1$ ). O material sedimentado ( $P_1$ ) foi ressuspenso em água bidestilada gelada e submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento, após os quais foi novamente centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. O novo sobrenadante ( $S_2$ ) foi recolhido e estocado a -20°C.

O sedimento resultante ( $P_2$ ) desse segundo ciclo de centrifugação foi ressuspenso em água. Em seguida, adicionou-se CHAPS (3-[(cholamido propyl)-dimethyl ammonio]-1-propanesulfonate) na proporção de 4 mg de detergente por mg de proteína. Essa mistura foi agitada brandamente em baixa temperatura durante 15 horas e em seguida centrifugada a 14.500 rpm (25.000 x g) em uma centrífuga Sorvall RC-5B, obtendo-se um novo sobrenadante ( $S_3$ ) e um novo sedimento ( $P_3$ ), cujos respectivos volumes foram acertados em balão volumétrico. Tal procedimento é semelhante ao adotado por CRISTOFOLETTI & TERRA (1999).

## 2.4.2 – Ensaio enzimáticos

A detecção da atividade enzimática foi realizada incubando-se a mistura de reação em banho-maria termostático (30°C) por diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (brancos de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A atividade observada foi expressa em nmoles de substrato ou ligação hidrolisada por minuto (mU, miliunidades).

Determinações fluorimétricas da atividade de tripsina foram realizadas com a utilização de dois substratos cumarínicos diferentes: N-carbobenzoxi-arginine-7-amido-4-methylcoumarin (CBZArgMCA – Sigma Aldrich) e N-carbobenzoxi-phenylalanine-arginine-7-amido-4-methylcoumarin (CBZPheArgMCA – Sigma Aldrich), ambos na concentração de 0,01 mM em tampão glicina NaOH, pH 9,0, 100mM. Para quimotripsina, utilizou-se o substrato cumarínico N-succinil-alanine-alanine-phenylalanine-7-amido-4-methylcoumarin (SAAPMCA – Sigma Aldrich), nas mesmas condições citadas acima.

A determinação de atividade de aminopeptidase foi realizada utilizando-se L-leucine-p-nitroanilide (LpNa – Sigma Aldrich) segundo Erlanger *et al.* (1961), na concentração de 1mM, em tampão glicina NaOH 100mM, pH 9,0.

A atividade de cisteína proteinase foi medida utilizando-se epon-amino-caproil-S-benzil-cystein-7-amido-4-methylcoumarin (E-NH<sub>2</sub>-MCA), na concentração de 1mM em tampão citrato-fosfato 50mM, pH 4,0.

A atividade de  $\alpha$ -glicosidase foi medida utilizando-se 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucoside (MU $\alpha$ glu – Sigma Aldrich), na concentração de 1mM em tampão citrato-fosfato 50mM, pH 6,0.

A atividade de proteinase total foi medida com caseína fluoresceína isotiocianato (caseína FITC) 0,5% em tampão citrato-fosfato 50ml pH 5,5.

### **2.4.3 – Determinação de proteínas**

As medidas de proteína foram realizadas conforme Smith et al., (1985), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

### **2.4.4 - Resolução cromatográfica das enzimas digestivas**

A amostra S<sub>1</sub> do homogeneizado intestinal de *H. suis* foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna High Q em sistema de baixa pressão Econo System (Bio Rad – EUA). A coluna foi equilibrada com tampão imidazol 20 mM, pH 7,0 e a eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,6 M e, em seguida com NaCl 1,0 M, no mesmo tampão em que a coluna foi equilibrada. As frações resultantes foram ensaiadas utilizando-se substratos sintéticos fluorescentes para tripsina, quimotripsina,  $\alpha$ -glicosidase e proteinase total.

## **RESULTADOS**

As observações que serão descritas a seguir, são válidas tanto para os animais fixados alimentados, quanto aqueles em jejum, uma vez que não foi possível detectar diferenças significativas do ponto de vista morfológico nas duas situações. Apenas com relação ao conteúdo luminal foi constatada alguma alteração, que será detalhada adiante.

## 1- ANATOMIA

O sistema digestivo de *H. suis* é formado, basicamente, por um tubo digestivo, sem quaisquer anexos na forma de cecos gástricos. Pode ser, anatomicamente, dividido em intestino anterior, médio (ventrículo) e posterior.

Tanto nos machos quanto nas fêmeas, o sistema digestivo é essencialmente igual. Na fêmea, o tubo digestivo apresenta as mesmas regiões e organização histológica, embora a presença do ovário e seu conteúdo (ver Fig. 8-B), altere sensivelmente sua forma pela compressão que exerce sobre o mesmo, obrigando-o a percorrer um trajeto mais sinuoso, que leva eventualmente, a um colapso da luz, visível em vários trechos. Assim, para uma maior clareza, passaremos a descrever o sistema digestivo do macho, por ser este de mais fácil descrição e compreensão (ver Fig. 9-A).

Observado sob microscópio estereoscópico, o tubo digestivo do *H. suis* inicia-se após a abertura bucal e se continua com o esôfago na forma de um tubo delgado, o qual, bruscamente, expande-se na região anterior do tórax (**Fig. 2-A**). Logo adiante, o tubo digestivo sofre uma ligeira constrição, que marca a divisão entre o intestino anterior e o médio (ou ventrículo). Logo após essa constrição, agora como intestino médio, volta a se expandir, mantendo um diâmetro semelhante ao do intestino anterior. Sem apresentar expansões na forma de cecos, continua-se pela



região posterior do tórax e abdômen, num trajeto retilíneo, sofrendo uma gradual e suave redução de diâmetro, enquanto se dirige para a região posterior do abdômen. No terço final do abdômen, o ventrículo dobra-se numa sinuosidade semelhante à letra "s", onde localizam-se os 4 túbulos de Malpighi que assinalam o término do intestino médio e início do posterior. Ao final da sinuosidade, observamos a papila retal e início do reto que volta a percorrer um trajeto retilíneo até o ânus.

## **2 - MICROSCOPIA DE LUZ**

### **2.1. Padronização da metodologia**

Para escolha da solução fixadora que apresentasse melhor resultado na preservação tecidual do tubo digestivo do *H. suis*, quando observado em microscopia de luz, verificamos que o material fixado com a solução segundo Junqueira, mostrou deficiências que inviabilizaram sua utilização. Os tubos digestivos observados, apresentavam áreas do epitélio com células bastante danificadas, com amplas áreas de desorganização citoplasmática, a ponto de dificultar o seu reconhecimento.

Por outro lado, os lotes tratados tanto com a solução fixadora segundo Zamboni quanto com aquela segundo Bouin, apresentavam-se bem preservados e com integridade celular plenamente satisfatória.

Devido ao fato de que os resultados da fixação se mostraram idênticos, tanto para o material fixado com Zamboni, quanto para aquele fixado com Bouin, optamos, daí por diante, pela adoção desta última como rotina, pela facilidade de preparo dessa solução.

A análise dos cortes em parafina, através de microscopia de luz, apontou deficiências que inviabilizaram o uso desse material de emblocagem para o intestino do *H. suis*. O tecido se apresentava fragmentado, com alguns trechos irreconhecíveis devido à perda de parte do epitélio, ocorrida com os banhos a que era submetido durante o processamento. Ainda, na etapa de montagem, pequenos fragmentos giravam, mudando de posição, imersos no líquido adesivo utilizado para manter a lamínula aderida à lâmina. Já os cortes em historesina, mantiveram sua integridade, permitindo adequada análise do material. Sendo assim, esta última técnica foi adotada como padrão.

## 2.2 - Glândula salivar

As observações feitas com microscopia de luz, nos animais fixados com a solução de eleição e emblocados em historesina, mostraram que a glândula salivar do *H. suis* é bem desenvolvida, localizando-se na cabeça e no início do tórax, possuindo a forma aproximada da letra "V". Tem início na extremidade anterior da cabeça, onde observamos uma massa celular, próxima à boca do animal. Dessa massa partem 2 cordões de células que se dirigem, cada um de um lado do canal alimentar, para a região posterior da cabeça. Os cordões ultrapassam o limite da cabeça, penetrando na região anterior do tórax, onde cada um termina em uma massa celular (**Fig. 3**). As células da glândula salivar são arredondadas e medem em média 12 $\mu$ m de diâmetro. Coradas pela solução corante segundo SATO & SHAMOTO (1973), que evidencia bem os grânulos de secreção, observamos 2 tipos de reação ao corante. Vemos um material de aspecto granular, que praticamente não assimilou o corante, tomando uma organização arredondada, distribuído em várias regiões do citoplasma. Entremeando com esse material, temos um outro, também granuloso, que se apresenta bem corado. O núcleo possui forma oval. Mostra-se claro e o nucléolo é visto com facilidade (**Fig. 3-DETALHE**).

### 2.3 - Tubo digestivo

O intestino anterior (IA) do *H. suis* percorre o interior da cabeça com o formato de um tubo revestido por um epitélio pavimentoso simples, revestido, apicalmente, por uma cutícula. Ao penetrar na cavidade torácica, expande-se para formar uma ampla cavidade (**Fig. 2-B**) que ocupa aproximadamente 2/3 do espaço torácico, tanto no sentido dorso-ventral quanto no lateral. Ventralmente, essa grande cavidade do IA apóia-se quase diretamente sobre a quitina do exoesqueleto, com apenas um pequeno espaço interposto entre os dois. Na região dorsal temos uma musculatura esquelética entre o intestino e o exoesqueleto.

Aproximadamente na região central do tórax, o epitélio dobra-se em direção à luz, formando uma evaginação que circunda todo o diâmetro do tubo digestivo (**Fig. 2-B; 4-A**).

O intestino médio tem início na região torácica, no lado oposto da evaginação onde termina abruptamente o IA.

A ampla cavidade formada pelo IA continua-se após a evaginação, como intestino médio (IM), mantendo dimensões semelhantes. Sendo assim, o intestino médio também se apoia ventralmente quase diretamente sobre a quitina do exoesqueleto, assim penetrando no abdômen.

A luz do intestino médio que, inicialmente, é bastante ampla, vai gradativamente diminuindo no sentido antero-posterior, enquanto percorre seu trajeto abdominal (**Fig. 2-B**). O conteúdo luminal, tanto do IA quanto do IM, visto pela microscopia de luz e independente da coloração utilizada, mostra naqueles animais pertencentes aos lotes fixados após jejum de 8 horas, a presença de um material homogeneamente corado, sem estrutura definida. Ou seja, o conteúdo assimilou o corante, embora nenhum material com forma definida possa ser percebido. Já naqueles animais fixados imediatamente no momento da coleta, observamos, na luz do tubo digestivo, um material granuloso ou ligeiramente filamentosos, disperso pela luz. Hemácias ou outros

elementos figurados do sangue, jamais foram identificados. Esse material é encontrado distribuído uniformemente ao longo de todo o tubo digestivo, podendo ser observado tanto no IA quanto no IM, assim como no intestino posterior (IP). Qualquer que seja o conteúdo da luz intestinal, parece estar em contato direto com a superfície celular, não sendo detectada, em todas as nossas observações, a presença de qualquer barreira que indique a existência de um gel peritrófico ou uma estrutura semelhante à membrana peritrófica.

Histologicamente, o IM é constituído por um epitélio simples, onde podemos identificar apenas um tipo celular. Cabe esclarecer que na literatura sobre insetos, esse tipo é denominado célula colunar (RIBEIRO et al., 1990). Mas, dada a grande diversidade morfológica que essas células apresentam ao longo do tubo digestivo de *H. suis*, variando do pavimentoso ao colunar, essa denominação torna-se inadequada. Assim sendo, usaremos o termo enterócito, que as identifica mais apropriadamente (**Fig. 2-C, D, E; 4-A, B; 5-B**). Os enterócitos apresentam na superfície apical, microvilosidades, que, freqüentemente, são abundantes e longas, quando observadas nos maiores aumentos do microscópio de luz. O núcleo, de forma oval e pouco corado, pode ocupar várias posições na célula, sendo mais freqüente na região mediana. Seu nucléolo, bastante evidente, posiciona-se centralmente. O citoplasma possui afinidade por corantes ácidos e mostra uma textura granulosa onde não se observam maiores detalhes citoplasmáticos.

Conforme já mencionamos, o enterócito possui grande variação de tamanho e forma, podendo apresentar-se pavimentoso, cúbico ou colunar. A versatilidade de formas permite que sejam observadas células com formato de clava, bastão, pequenas elevações, enfim, com inúmeras morfologias. Dentre as que apresentam formas colunares, algumas possuem largura sempre constante, desde a membrana basal até o ápice, enquanto outras possuem extremidade apical afilada, ou arredondada. Outra característica que merece destaque, é o fato de alguns enterócitos se justaporem lateralmente para formar grupamentos celulares

semelhantes às vilosidades encontradas em epitélios digestivos de vertebrados.

Alguns enterócitos, ocasionalmente, apresentam seu citoplasma tomado por um material granuloso ou filamentososo, que leva a um aumento progressivo do volume celular. Essas células são encontradas apenas na região anterior e central do intestino médio, sendo mais abundante nesta última (**Fig. 2-C, D; 4-B; 5-A**). Apresentam forma arredondada, algumas vezes semelhante a um cálice, com altura variada. Possuem núcleo oval, pouco corado e com nucléolo evidente. Seu citoplasma abriga, na região central, um material de aspecto granuloso ou filamentososo, cuja quantidade é variável de uma célula para outra. Naquelas onde o volume desse material é maior, o citoplasma encontra-se comprimido para a periferia e pode ser visto como um anel de espessura variável, rodeando o material central. Em algumas dessas células maiores, o citoplasma da região apical parece abrir-se, recolhendo-se em direção basal, deixando exposto o material que está abrigado no seu interior. Estas células correspondem aos chamados micetócitos (**Fig. 2-C, D; 4-B; 5-A**), descritos por vários autores e que abrigam bactérias simbiotes (AKHTAR & VAN EMDEN, 1994; ABE et al., 1995; BAUMANN & MORAN, 1997; ZELAZOWSKA & BILINSKI, 1999).

Na luz intestinal, próximo ao epitélio, observamos várias estruturas arredondadas de aspecto semelhante à do material contido nos micetócitos, sem nenhum contato aparente com o epitélio, dando uma forte sugestão de ter sido liberado do micetócito, para a luz do intestino.

Uma análise morfológica detalhada do epitélio do IM, levou à detecção de algumas diferenças morfológicas ao longo dessa região do tubo digestivo (ver desenho esquemático na Fig. 23-A, B, C). Com base nessas diferenças, o IM pode ser subdividido em 3 regiões (**Fig. 2-B, C, D, E**). A região que recebe o alimento que chega do IA, que será aqui chamada de intestino médio anterior, IMA, apresenta, em seu epitélio, muitas células de morfologia colunar (**Figs. 2-B, C; 4-A, B**). Essas células exibem uma extremidade apical predominantemente afilada,

podendo ser vistas isoladas ou em duplas, com o núcleo posicionado centralmente. São ladeadas por células pavimentosas, também cobertas por microvilosidades. Nessa região do IM é possível encontrar alguns micetócitos.

Na região mais central do IM, aqui denominada intestino médio central, IMC (**Fig. 2-B, D**), também vemos células colunares como as já citadas, mas com uma morfologia um tanto diferente daquela do IMA. Além daquelas com extremidade afilada, existem outras, cujo diâmetro permanece constante até o ápice, ou com a extremidade apical dilatada. Os micetócitos estão presentes em maior quantidade no IMC que no IMA (**Figs. 2-D; 5-A**) e não estão distribuídos uniformemente pelo epitélio, tendo, nos cortes observados de cada animal, localização preferencial por um dos lados do epitélio.

A região posterior do intestino médio, IMP (**Figs. 2-B, E; 5-B**), tem diâmetro mais reduzido que o do IMA e IMC. E enquanto esses dois segmentos do intestino médio têm percurso retilíneo, o IMP desenvolve sinuosidades no interior da região posterior do abdômen. Aqui encontramos o tubo digestivo também revestido por um epitélio onde, embora a morfologia celular predominante seja a cúbica, podemos encontrar também, aquelas de forma colunar baixa, quase sempre ladeadas por células pavimentosas (**Fig. 5-B**). No IMP não localizamos micetócitos.

O intestino posterior, IP, tem início na região de inserção dos túbulos de Malpighi. Aqui percebe-se, claramente, a mudança do epitélio, que passa de cúbico simples com microvilosidades do IMP, para cúbico simples revestido por cutícula (**Fig. 6-A**). Em algumas áreas, essa lâmina de cutícula mostra-se claramente visível e em outras, imperceptível à microscopia de luz. Na área das papilas retais, observamos claramente um epitélio pavimentoso com cutícula (**Fig. 6-B**).

### 3.3 - MICROSCOPIA CONFOCAL

A observação, ao microscópio confocal, de cortes histológicos do epitélio do tubo digestivo do *H. suis*, processados com a utilização de WGA conjugado com fluoresceína e em presença de competidor, permitiu-nos constatar a não existência de uma reação de fluorescência significativa, que evidenciasse a ocorrência de membrana peritrófica (**Fig. 7-A, B, C, D**).

### 3.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura, da região anterior externa da cabeça do *H. suis*, mostram, no lábio superior, ou labrum, o orifício por onde são evertidos os estiletos necessários para sua alimentação. Ali vemos também o lábio inferior e a abertura da boca (**Fig. 8-A**), por onde será succionado o sangue do hospedeiro.

Em uma visão obtida, pela mesma técnica, através de corte sagital, podemos observar que nas fêmeas, conforme anteriormente mencionado, o conteúdo dos ovariolos comprime o tubo digestivo, deformando o seu trajeto (**Fig. 8-B**). Nos machos, a observação fica facilitada pela ausência de ovos, o que permite uma visão panorâmica e um melhor entendimento da sua morfologia anatômica e histológica (**Fig. 9-A**).

Pela análise do tubo digestivo ao microscópio eletrônico de varredura, notamos que existe uma nítida transição entre o IA e o IM. Ali o epitélio evagina, formando uma dobra ou prega, que separa esses dois segmentos do tubo digestivo (**Fig. 9-A, B**).

Outra característica que chama a atenção, é a maior irregularidade da superfície do epitélio do intestino médio, quando comparada com o intestino anterior. Isso, entretanto, advém da presença, no IM, de células altas e baixas, interpondo-se umas às outras, num relevo bastante acidentado, em oposição às células pavimentosas recobertas por cutícula, do IA.

No intestino médio, o epitélio está revestido por microvilosidades (**Fig. 10-A, B**), que, em grande aumento mostram-se retilíneas e não ramificadas. Nas células do IMA e IMC, chama a atenção a presença de vesículas brotando da extremidade das microvilosidades, indicando a existência de um mecanismo de secreção microapócrino (**Fig. 10-A**).

Outra característica do IMA e IMC é a presença de células grandes, de formato semelhante a um cálice, com a região basal nitidamente mais delgada, que são os micetócitos, já descritos anteriormente (**Fig. 10-B**). Nessas células também percebemos vesículas de secreção brotando da extremidade das microvilosidades (**Fig. 10-A**). Alguns micetócitos, que tiveram parte da membrana celular e do citoplasma destacados, mostram, no seu interior, um conjunto de várias estruturas em forma de bastão, semelhantes a bactérias, que chegam a medir por volta de  $18\mu\text{m}$  (**Fig. 11-A**). Essas estruturas estão organizadas num arranjo arredondado que pode ser localizado fora dos limites celulares, na luz do intestino médio (**Fig. 11-B**).

### 3.5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Das 4 soluções fixadoras utilizadas para preservação tecidual do tubo digestivo do *H. suis*, pudemos constatar que a qualidade do material fixado com a solução segundo Karnovsky, foi sempre superior àquela demonstrada pelos demais fixadores. Portanto, esta solução foi escolhida como fixador de rotina para este material.



A análise com microscopia eletrônica de transmissão limitou-se ao intestino médio, por ser esta a região mais importante do ponto de vista da digestão. Como já mencionado na descrição dos resultados de microscopia de luz, o epitélio do IM do *H. suis* apresenta apenas 1 tipo celular: o enterócito. Visto pela microscopia eletrônica de transmissão, é uma célula cuja membrana plasmática apical está modificada na forma de microvilosidades, que se projetam para a luz intestinal. Essas microvilosidades, raramente ramificadas, contêm em seu interior, feixes de microfilamentos dispostos longitudinalmente (**Fig. 12-A**). O comprimento das microvilosidades apresenta variações: nas células do IMA e IMC, é menor, enquanto que no IMP é maior (**Fig. 12-A, B, C**). Com aumentos maiores, é possível observar, recobrando as microvilosidades, um material com aspecto granuloso fino que deve corresponder ao glicocálix (**Fig. 18-A**).

Confirmando os dados obtidos pela histologia e pela marcação com fluorescência, não foi constatada a presença de membrana peritrófica, através da análise dos cortes ultra-finos. Também não encontramos nenhuma evidência de ocorrência de membrana perimicrovilar ou gel peritrófico nas três regiões do IM.

Com relação às superfícies laterais dos enterócitos, observamos a presença de junções septadas lisas (LANE & SKAER, 1980; LANE, 1984), mais comuns e evidentes na região apical (**Figs. 12-D; 13-A, B, C; 19-C**). As membranas plasmáticas laterais apresentam, também, freqüentes sinuosidades, formando interdigitações (**Figs. 13-D; 19-C**). Não é possível distinguir diferenças quanto à complexidade das membranas laterais, quando comparamos as 3 regiões do IM.

A superfície basal das células está apoiada sobre uma lâmina basal cuja espessura varia consideravelmente, oscilando entre 0,8 $\mu$ m e 2 $\mu$ m. Em geral, a lâmina basal é mais espessa no IMP.

A membrana plasmática que está em contato com a lâmina basal, apresenta invaginações, formando uma rede de canais e espaços, com mitocôndrias associadas (**Fig. 14-A, B, C, D**). As invaginações da membrana plasmática basal assumem uma complexidade maior no IMP (**Figs. 13-D; 14-C**), que no IMA e IMC (**Figs. 14-A, B, D; 15-A; 19-A**). Observamos, ainda, no IMP, um número ligeiramente maior de aberturas da membrana plasmática basal, voltadas para a lâmina basal (**Figs. 13-D; 15-B**).

As mitocôndrias observadas nos enterócitos estão distribuídas por todo o citoplasma. Podemos vê-las associadas às invaginações da membrana plasmática basal e, algumas vezes, concentrando-se em maior número na região apical. Seu formato varia de arredondadas a ovais e chamam a atenção por seu grande número (**Figs. 12-C; 14-D; 15-B, C**). Quanto ao tamanho, podemos encontrá-las maiores, em algumas células e menores em outras. Suas cristas desenvolvem trajetos tortuosos e a matriz mitocondrial, em algumas células, possui um aspecto mais eletrondenso que o citoplasma (**Figs. 14-D; 15-D**). Em qualquer das 3 regiões do IM, podemos encontrar células onde as mitocôndrias estão em íntima proximidade com a base das microvilosidades (**Figs. 13-B; 14-B**).

Nas regiões IMA e IMC, mas não na IMP, observamos grânulos de secreção na região apical, próxima à base dos microvilosidades (**Figs. 16-C, D; 17-B, C**) e no seu interior (**Figs. 12-B; 13-B; 17-A, D; 18-A**). Esses grânulos são revestidos por membrana e apresentam perfil circular ou oval, apresentando um conteúdo de aspecto granular, de baixa eletrondensidade. Podemos vê-los ainda ocupando o interior das microvilosidades, na sua região mediana ou apical (**Figs. 12-B; 17-D; 18-A**). Embora sejam localizados facilmente no IMA e IMC, os grânulos de secreção não são vistos nos enterócitos do IMP. Na Fig. 24-A temos a representação esquemática de um enterócito com sua via de secreção.

Os enterócitos do IM apresentam de modo geral, áreas de complexos de Golgi distribuídas da região mediana da célula, para apical (**Figs. 17-B; 18-B, C**). São constituídas, freqüentemente, por conjuntos de cisternas e vesículas bem dilatadas, associadas a vesículas semelhantes a grânulos de secreção (**Fig. 18-B, C**). Em comparação com o IMA e IMC, as células do IMP possuem menos áreas de Golgi.

O retículo endoplasmático granular é abundante nas células do epitélio do IM das 3 regiões estudadas. Distribui-se por todo o citoplasma (**Fig. 14-C; 19-C**), às vezes como cisternas isoladas, sinuosas e dilatadas (**Figs. 13-D; 14-C; 19-B**). Outras vezes, formando conjuntos paralelos e pouco dilatados (**Figs. 13-C; 16-B; 18-D**). Ribossomos livres, aparentemente não ligados às membranas do retículo endoplasmático, são notados por todo o citoplasma, em grande quantidade (**Figs. 13-D; 15-A; 16-B; 17-C; 19-A, B, C, D**).

Espalhados pelo citoplasma dos enterócitos das 3 regiões do IM, microtúbulos podem ser vistos sem exibir uma orientação definida (**Fig. 18-D**).

O núcleo dos enterócitos pode ser observado ocupando, normalmente, uma posição central na célula. Visto pela microscopia eletrônica de transmissão, sua forma é freqüentemente oval (**Figs. 19-D; 20-A**). A carioteca, com sua típica dupla membrana, apresenta poros (**Figs. 15-D; 19-D; 20-A, B**) e circunscreve um nucleoplasma de baixa eletrondensidade, com alguns grumos pequenos de cromatina, aleatoriamente distribuídos pelo nucleoplasma e pela face interna da carioteca. O nucléolo é bem evidente e pode ser freqüentemente observado no interior do núcleo (**Figs. 12-C; 13-B; 15-B; 20-A**).

Conforme nossos resultados de microscopia de luz e eletrônica de varredura já mostraram, alguns enterócitos do tubo digestivo de *H. suis* exibem a presença de bactérias no interior do citoplasma. Essas células,

denominadas micetócitos, foram observadas histologicamente e ultra-estruturalmente no IMA e IMC, não tendo sido localizadas no IMP (**Fig. 21-A, B, C, D**). As bactérias do micetócito mostram-se como bacilos alongados que podem chegar aos 18 $\mu$ m de comprimento. Sua análise em grande aumento, mostra uma estrutura com as características de parede bacteriana e o seu interior apresenta um material de aspecto granuloso.

Nossos resultados mostram uma seqüência de eventos bastante significativos que ocorrem durante a diferenciação dos micetócitos e que estão representados esquematicamente na Fig. 24-B. O processo inicia-se com a presença de poucas bactérias, cujo conjunto permanece rodeado por uma membrana de origem não determinada, no interior do enterócito que irá se diferenciar em micetócito. A partir de então, vemos que ocorrem alterações morfológicas intensas, no citoplasma e na célula como um todo, que levarão à formação do micetócito. Chama a atenção o número de mitocôndrias, que cresce de maneira muito acentuada. O retículo endoplasmático granular também é observado em quantidade muito maior que em enterócitos normais. Frequentemente, podemos ver suas cisternas dispostas paralelamente, ou distribuídas de forma concêntrica (**Fig. 20-C, D**).

O aumento quantitativo das organelas, somado ao crescimento em volume e quantidade das bactérias no interior do citoplasma, leva a um grande crescimento da célula (**Fig. 21-A, B, C**). Com isso, o citoplasma torna-se mais delgado, pressionado pelo grande volume interno, formando, no final do processo, um tênue filme periférico, de onde se destacam várias mitocôndrias (**Fig. 21-C, D**). Quando plenamente desenvolvido, o micetócito é bem mais alto que os enterócitos (**Fig. 21-B**). Nesse estágio, a membrana que rodeia o conjunto de bactérias, funde-se com a membrana citoplasmática. Esse processo tem início na região apical do micetócito e progride, lateralmente, em direção basal, promovendo uma gradual liberação das bactérias, sem nenhum tipo de revestimento, na luz do ventrículo.

Aglomerados arredondados de bactérias, semelhantes àqueles vistos no interior dos micetócitos, foram observados algumas vezes na luz do IM, sem nenhum contato aparente com qualquer célula do epitélio e desprovidos de membrana. Alguns apresentam sinais de desorganização estrutural, sugerindo estarem sendo digeridos (**Fig. 21-D, DETALHE**).

### 3.6 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

#### 3.6.1 – Determinação de atividade enzimática

Os dados referentes às atividades enzimáticas obtidas, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Atividades enzimáticas nas diferentes frações do homogeneizado de tubos digestivos de *H. suis*.

Enzima	Substrato	Solúvel (S <sub>1</sub> )	Glicocálix (S <sub>2</sub> )	Membranas em detergente	
				Solúvel (S <sub>3</sub> )	Insolúvel (4)
Tripsina	CBZArgMCA	243 (8300)	30,5 (26000)	63,8 (70500)	9,51 (7950)
Quimotripsina	SAAPMCA	48,7 (1550)	2,66 (1740)	2,27 (2510)	1,09 (1640)
Cys-proteinase	E-NH <sub>2</sub> -MCA	1,02 (40,0)	2,36 (2040)	4,00 (4290)	2,63 (3660)
Aminopectidase	LpNa	0,31 (9,8)	0,35 (2330)	5,40 (5050)	0,040 (74,9)
α-Glicosidase	MUα-glu	4,35 (143)	0,35 (310)	0,307 (293)	0,121 (202)

Os valores referem-se às médias das atividades expressas em mUnidades/animal e atividades específicas (entre parêntesis) em mUnidades/mg de proteína (n = 3). As atividades foram calculadas com base num ensaio de 4 tempos, realizados em 3 lotes distintos, contendo 50 animais em cada. S<sub>1</sub>: sobrenadante proveniente da primeira centrifugação do material homogeneizado de *H. suis*; S<sub>2</sub>: sobrenadante obtido após centrifugação do material ressuspenso do primeiro precipitado que foi submetido a 3 ciclos de congelamento/descongelamento; S<sub>3</sub>: sobrenadante obtido após solubilização do segundo precipitado utilizando CHAPS; 4: precipitado resultante da centrifugação do material solubilizado com CHAPS. Os desvios-padrão da média (SEM) encontrados foram inferiores a 30% das médias.

Os dados sugerem que tripsina, quimotripsina e  $\alpha$ -glicosidase sejam enzimas solúveis, ao passo que aminopeptidase apresenta-se preferencialmente associada à membrana plasmática dos enterócitos. Cisteína proteinase apresenta, aparentemente, formas solúveis associadas ao glicocálix e à membrana plasmática.

### 3.6.2 – Resolução das atividades enzimáticas intestinais

Cromatografia de troca iônica em coluna High Q em sistema de baixa pressão Econo System (Bio Rad).

As frações resultantes da cromatografia realizada com a amostra  $S_1$  do homogeneizado de tubo digestivo de *H. suis* foram ensaiadas com um substrato protéico fluorescente – caseína FITC – e com quatro substratos artificiais fluorescentes: CBZArgMCA (específico para serino-proteinases, tais como tripsina), CBZPheArgMCA (também específico para serino-proteinases como tripsina), SAAPMCA (específico para outras serino-proteinases, como quimotripsina) e MU $\alpha$ glu (específico para  $\alpha$ -glicosidases).

O resultado está apresentado na **Fig. 22**. Com base nos perfis de atividade apresentados nos ensaios realizados com caseína FITC e com os substratos artificiais para serino-proteinases, pode-se inferir quantas formas de cada tipo de proteinase *H. suis* apresenta.

O gráfico A da Figura 22 apresenta quatro picos de atividade principais (1, 2, 3 e 4) sobre caseína FITC, substrato protéico fluorescente. Considerando-se o exposto e comparando-se os gráficos A e B, verificamos que os dois picos de atividade em B correspondem aos picos 1 e 2 apresentados em A, o que sugere que, contribuindo para a atividade proteinásica sobre caseína FITC, pelo menos duas espécies moleculares principais de tripsina estejam presentes, uma vez que o substrato fluorescente artificial utilizado nesse ensaio, CBZArgMCA é

específico para tripsina. Entrementes, pode-se verificar que o pico de atividade 2 no gráfico B não é absolutamente simétrico, apresentando um certo arrasto de atividade por algumas frações da cromatografia (esse arrasto tem seu correspondente no gráfico A). Esse detalhe sugere que existam mais formas de tripsina presentes no pico 2 que não foram adequadamente discriminadas pelas condições nas quais a cromatografia foi realizada (para maiores detalhes, vide Material e métodos).

O gráfico C também apresenta três picos de atividade correspondentes aos picos 1 e 3 do gráfico A e aos picos 1 e 2 do gráfico B. O substrato utilizado, CBZPheArgMCA, também é específico para tripsina. O resultado novamente sugere que tripsina esteja envolvida na atividade proteinásica de *H. suis* e que são pelo menos duas espécies moleculares cuja migração na matriz da coluna High Q são distintas. Tal como ocorre com o pico de atividade 2 do gráfico B, o pico de atividade 3 do gráfico C também não é simétrico, assemelhando-se ao pico 2 do gráfico B, sugerindo dessa forma as mesmas conclusões.

Ao se analisar o gráfico D, uma situação semelhante à descrita para tripsina pode ser assumida para quimotripsina, já que há dois picos de atividade sobre SAAPMCA, coincidentes respectivamente aos picos 1 e 4 do gráfico A.

Nessa análise preliminar, os dados sugerem a existência de pelo menos duas espécies moleculares distintas de tripsina e quimotripsina entre as proteinases presentes no tubo digestivo de *H. suis*.

A análise do gráfico E mostra a presença de pelo menos uma forma de  $\alpha$ -glicosidase, visto que o pico de atividade é aproximadamente simétrico e está deslocado em relação aos picos de atividade proteinásica.

Assim sendo, os dados sugerem que, dentre as proteinases atuando no tubo digestivo de *H. suis*, tripsina e quimotripsina estejam presentes, apresentando pelo menos três e duas formas principais de cada uma, respectivamente, e que haja apenas uma forma de  $\alpha$ -glicosidase presente, cuja eluição não é absolutamente coincidente com os picos de atividade proteinásica apresentados.

**DISCUSSÃO**



Antes de iniciarmos a discussão propriamente dita, sobre o sistema digestivo do *H. suis*, consideramos necessário fazer alguns comentários sobre aspectos da metodologia empregada na análise morfológica.

Movidos pela suspeita de que a técnica de fixação para microscopia eletrônica, utilizada rotineiramente no laboratório (solução fixadora 1, citada em material e métodos) estava gerando artefatos nas preparações, principalmente uma certa dilatação das mitocôndrias em algumas células, achamos conveniente testar outras soluções fixadoras. Após analisarmos os resultados obtidos com o uso de várias soluções de glutaraldeído, sem e com concentrações variadas de sacarose e também com a solução de KARNOVSKY (1965), verificamos que os tecidos que mostraram melhores condições de preservação foram aqueles fixados com o uso da solução segundo KARNOVSKY (1965).

A fim de contribuir para ampliar as opções relativas às técnicas de coloração, cabe aqui alguma referência à técnica de coloração segundo SATO-SHAMOTO (1973), descrito no capítulo material e métodos. Esse corante foi originalmente criado por seus autores, para cortes semi-finos de microscopia eletrônica de transmissão. Mas, curiosamente, os resultados que obtivemos utilizando-o para essa finalidade não foram satisfatórios, já que reagia de maneira muito fraca com os tecidos a serem corados. Mostrou, no entanto, ótimos resultados para corar tecidos incluídos em historesina, sobretudo na marcação diferencial de grânulos de secreção acidófilos e basófilos.

Iniciando a discussão sobre o sistema digestivo de *H. suis*, chamamos a atenção para o fato de que, embora inúmeros trabalhos mostrem que, na organização do sistema digestivo de insetos, possa existir grande diversidade anatômica e graus variados de complexidade (WATERHOUSE, 1957; TREHERNE, 1962; HOUSE, 1964; WIGGLESWORTH, 1972; CRUZ-LANDIM, 1985; TERRA, 1988; RIBEIRO et al., 1990), constatamos que o *H. suis* possui um sistema digestivo

relativamente simples, formado por um tubo digestivo (intestino) constituído por um intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP), que sofre apenas, uma pequena sinuosidade em forma de "S", no final do IM e início do IP. O intestino inicia-se pela abertura bucal, que é constituída pelo lábio inferior e, acima dele, um labrum, o qual possui um orifício por onde saem os estiletes perfurantes. Estruturas como papo ou cecos gástricos, não estão presentes. Conforme demonstrado, tanto pela análise histológica quanto pela microscopia eletrônica, não existe nenhuma estrutura visível que separe o conteúdo luminal entre o IA e o IM. Observa-se, naquela região, uma evaginação do epitélio em forma de prega, mas que, além de ser relativamente curta, não possui nenhuma musculatura, o que seria imprescindível para a formação de um esfíncter. Quanto à transição do IM para o IP, a análise de cortes seriados de microscopia de luz, indica a presença de um esfíncter regulando a passagem do conteúdo luminal.

Em todo o material analisado, jamais foram observadas, na luz do intestino, hemácias ou leucócitos íntegros, ou mesmo quaisquer fragmentos celulares ao longo do tubo digestivo. Isso nos remete ao fato de que, na saliva do *H. suis* deve haver enzimas ou outras substâncias que promovam a lise de elementos do sangue, antes mesmo da sua sucção para o interior do intestino. Com relação a este ponto, sabemos que, em vários insetos, a fase inicial da digestão é extra-intestinal e que, por exemplo, larvas de formigas, antes de se alimentarem, descarregam uma secreção fortemente proteolítica sobre o alimento (WIGLLESWORTH, 1972). Por outro lado, em uma revisão sobre a saliva de insetos sugadores de sangue, RIBEIRO (1987) menciona que, embora se especulasse sobre um possível papel proteolítico da saliva, BINNINGTON & KEMP (1980) não conseguiram localizar atividade proteolítica na saliva de carrapatos. Embora muito tenha sido estudado sobre a saliva de insetos sugadores de sangue, quase nada é mencionado a respeito da presença, na saliva, de enzimas que estejam envolvidas no processo digestivo desses insetos (EDMAN & KALE, 1971; GOODING, 1972;

LAVOPIERRE et al., 1979; RIBEIRO et al., 1984; HOFFMAN, 1995; JONES, 1998). Os autores têm se atido predominantemente às propriedades antihemostáticas, vasodilatadoras e inflamatórias da saliva (CHINERY & AYITEY-SMITH, 1977; NOBLE, 1982; WIRTZ, 1988; RIBEIRO, 1995; MUMCUOGLU et al., 1996).

A glândula salivar do *H. suis*, ainda não descrita na literatura, é um órgão proporcionalmente volumoso, em forma de "V". O vértice do "V" é uma pequena massa celular na extremidade anterior da cabeça, de onde partem dois cordões celulares. Cada cordão percorre a cabeça de um lado do canal alimentar, dirigindo-se até o início do tórax, onde termina em duas massas celulares. O fato de não encontrarmos ductos secretores, é condizente com BUXTON (1947), que, ao descrever a glândula salivar em *Pediculus humanus*, afirmou que a glândula como um todo, já é um aparente ducto salivar.

Histologicamente, vimos que o ventrículo do *H. suis* é revestido por um epitélio simples, cujas células são caracterizadas por um grande polimorfismo. Achamos oportuno comentar que, conforme descrito por vários autores, os insetos possuem o ventrículo revestido por epitélio cujas células possuem morfologia colunar (PRIESTER, 1971; HECKER, 1977; BILLINGSLEY, 1990; RIBEIRO et al., 1990; CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 1999). Com base nessa característica, o termo célula colunar vem sendo utilizado há tanto tempo para designar as células que desempenham as principais funções no processo digestivo de insetos (WIGGLESWORTH, 1972; KING & AKAI, 1982; RIBEIRO et al., 1990; TERRA, 1990), que essa denominação ultrapassou os limites da morfologia, incorporando um caráter fisiológico. No entanto, torna-se inadequado, no presente caso, denominarmos de células colunares aquelas que estão revestindo o ventrículo do *H. suis*, cuja morfologia, além de variar de pavimentosa a colunar, apresenta, mesmo dentro dessa classificação, muitas variações morfológicas. Portanto, o termo que nos pareceu mais apropriado e abrangente para denominá-las foi enterócito.

Os resultados ultra-estruturais confirmaram que o epitélio do IM do *H. suis* é constituído por um mesmo tipo celular, o enterócito. Células endócrinas, muitas vezes presentes em ventrículos de outros insetos (RIBEIRO et al., 1990), não foram observadas. Também não identificamos células regenerativas, encarregadas de repor perdas do epitélio (CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 1999). Contudo, em alguns insetos, essas células realmente não foram identificadas (MARTOJA & BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

Um dos aspectos que mais chama a atenção no ventrículo de *H. suis*, é a variedade de formas apresentada pelas células, que fica melhor visualizada pela microscopia eletrônica de transmissão. Vemos células com os mais variados formatos, e grande variação de altura. Essa variação deve ter reflexos na fisiologia celular, embora não se note variações significativas nas estruturas presentes em seu citoplasma.

A adesão entre as células do ventrículo de *H. suis* é dada por especializações juncionais denominadas junções septadas lisas, também conhecidas por junções contínuas (GREEN et al., 1983). Elas são um tipo especial de junção septada e se diferenciam das junções septadas típicas, encontradas em outros insetos, por não mostrarem septos transversais, facilmente visíveis à microscopia eletrônica de transmissão, entre as membranas plasmáticas de células contíguas (LANE & DILWORTH, 1989). Quando impregnadas com lantanium, no entanto, os septos transversais das junções septadas lisas são claramente visíveis (NOIROT apud STAEHELIN, 1974). Estas junções formam uma faixa ao redor do bordo luminal dos enterócitos que, além da coesão celular, devem proporcionar a formação de uma barreira de permeabilidade no epitélio, controlando a difusão paracelular de pequenas moléculas e íons, assim como bloqueando a passagem de moléculas maiores, ou macromoléculas. Neste particular, as junções septadas devem ter um papel equivalente às zônulas de oclusão, encontradas nos epitélios de vertebrados (LANE & SKAER, 1980; WEISS, 1983; LANE, 1984). Como se sabe, as barreiras de

permeabilidade têm uma importância fundamental no sentido de contribuir para a manutenção das diferenças de composição do meio extra-celular, nas duas faces do epitélio (GREEN et al., 1983; LANE, 1984; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Abaixo da região juncional, as membranas laterais formam interdigitações, que são mais elaboradas da região mediana das células, para a basal. Não foi possível notar alterações significativas nas interdigitações, comparando as três regiões do ventrículo.

Os enterócitos, como células epiteliais típicas, exibem uma polaridade muito bem definida, com sua superfície apical bastante diferenciada da basal. A membrana plasmática apical apresenta-se modificada na forma de microvilosidades, que se projetam em grande número para a luz do IM. Em seu interior, podemos observar feixes de microfilamentos que se continuam para dentro do citoplasma apical, fazendo parte da trama terminal. O IMP possui microvilosidades mais longas e em quantidade um pouco superior ao IMA e IMC.

Já a membrana plasmática basal, encontra-se modificada na forma de invaginações com mitocôndrias associadas, que criam, muitas vezes, uma rede elaborada de pequenos canais que chegam a dar à região basal um aspecto vacuolizado. A complexidade desse labirinto formado pela membrana plasmática basal, aumenta gradualmente em direção ao IMP. Ali, inclusive, podemos observar uma quantidade ligeiramente maior de aberturas para o espaço extracelular, quando comparado com o IMA e IMC, fazendo com que o IMP tenha, em princípio, um maior potencial de tomada de água da hemolinfa, que o IMA. De fato, esse tipo de organização da membrana plasmática basal, associada às mitocôndrias, está relacionada com o transporte de água e íons (FERREIRA et al., 1981; RIBEIRO et al., 1990). Células com um número maior de aberturas, estão vinculadas ao transporte de água para a luz do ventrículo e células com poucas aberturas, com o transporte de água, da luz para a hemolinfa.

Estudo nesse sentido, feito em *Rhynchosciara americana* (FERREIRA et al., 1981), introduziu a base morfológica para o modelo de circulação endo-ectoperitrofica, onde o conceito de um fluxo contra-corrente, já mencionado na introdução deste trabalho, foi sugerido. Nesse modelo, confirmado em outros insetos (SANTOS et al., 1983; ESPINOZA-FUENTES & TERRA, 1987; FERREIRA et al., 1994), a água secretada pelas células do IMP de *R. americana* segue um trajeto pósterio-anterior, sendo absorvida pelas células dos cecos gástricos, na região anterior do ventrículo.

A polaridade celular se faz presente, também, na distribuição das organelas citoplasmáticas. As mitocôndrias, por exemplo, estão presentes em todo o citoplasma, mas encontram-se, em geral, em maior número, no citoplasma apical e associadas às invaginações da membrana basal. A maior quantidade de mitocôndrias junto à superfície apical, deve ser resultado de um maior consumo de ATP por enzimas e/ou sistemas de transporte ligados à membrana plasmática apical, enquanto que, na superfície basal, deve ter ligação com os sistemas de transporte de íons e água associados às invaginações da membrana plasmática. O fato de termos encontrado mitocôndrias de aspecto dilatado, em algumas células, nos parece ter relação com os micetócitos. Nestes, elas realmente são maiores que em enterócitos, e, embora não tenhamos encontrado evidências diretas que confirmassem tal fato, essas células com mitocôndrias maiores, podem ser micetócitos em seus primeiros estágios de diferenciação.

O retículo endoplasmático granular é encontrado em abundância nos enterócitos, ao longo de todo o ventrículo, embora sua presença se faça sentir com mais intensidade no IMA e IMC. Sua distribuição intracelular não mostra uma região preferencial, sendo observado, em geral, em todo o citoplasma. Apresenta-se como cisternas isoladas, ou em arranjos mais elaborados, tomando a forma de conjuntos de cisternas paralelas, ou como arranjos concêntricos, algumas vezes semelhantes a

espirais de grandes dimensões, numa clara demonstração de intensa síntese protéica. Configurações concêntricas do retículo endoplasmático granular são, muitas vezes, consideradas como representando uma hiperatividade desta organela (THREADGOLD, 1976). Ribossomos livres estão também presentes abundantemente pelo citoplasma.

Complexos de Golgi, na forma de dictiossomas (MOLLENHAUER & MORRE, 1994; PIRCH & GREVEN, 1994), são freqüentemente observados ocupando regiões do citoplasma que vão da região média até o ápice celular. Não são, normalmente, observados no citoplasma basal. São constituídos por conjuntos de cisternas bem dilatadas e vesículas associadas. Nas regiões anterior e central do ventrículo, sua presença é bem maior que na posterior. Na região apical do IMA e IMC, grânulos de secreção de perfil circular e pouco eletrondensos, podem ser observados associados às cisternas dos complexos de Golgi, próximos à membrana plasmática apical e em íntimo contato com a base das microvilosidades, mas jamais fundindo-se a ela. Outras vezes, são vistos no interior das microvilosidades, tanto na sua região mediana, quanto nas suas extremidades. A presença de grânulos de secreção apenas nos enterócitos do IMA e IMC, coincide com uma maior quantidade de cisternas do retículo endoplasmático granular e áreas de Golgi. Assim, a presença de quantidades significativamente maiores de organelas relacionadas à via intracelular de secreção, indica um maior potencial secretor dos enterócitos localizados no IMA e IMC.

Com relação aos mecanismos de liberação da secreção sintetizada pelas células em geral, existem, basicamente, três mecanismos conhecidos: merócrino, apócrino e holócrino (WEISS, 1983; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). No mecanismo merócrino, as células liberam sua secreção pela fusão da membrana dos grânulos secretores, com a membrana plasmática apical, através de um fenômeno de fusão de membranas, denominado exocitose (AVERY et al., 1999), que leva à saída apenas do produto a ser secretado. São exemplos de secreção

merócrina, as células do pâncreas exócrino e das glândulas salivares de mamíferos (SEGAWA, 1998; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). O mecanismo apócrino é uma outra maneira de liberação de secreção, na qual, junto com os grânulos que contêm a secreção, uma pequena fração do citoplasma apical, é igualmente eliminada (WILHEM et al., 1998; AUMÜLLER et al., 1999). Como exemplos deste mecanismo, temos as células do intestino médio de alguns insetos (CRISTOFOLETTI, et al., 2001) e das glândulas sudoríparas e mamárias de mamíferos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Existe um subtipo do mecanismo apócrino, denominado microapócrino, no qual os grânulos contendo as enzimas penetram nas microvilosidades, migram até sua extremidade, sendo então liberados para a luz, junto com a porção terminal das microvilosidades (SANTOS et al., 1983; JORDÃO et al., 1999; BOLOGNESI et al., 2001). O terceiro tipo é denominado holócrino. Nele, todo o conteúdo celular é eliminado junto com a secreção (YOSHIKOSHI & KO, 1991; WELSCH et al., 1998), como é o caso das células das glândulas sebáceas de mamíferos e salivares de moluscos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; MOURA, 2001).

Em *H. suis*, a observação dos enterócitos comprometidos com a produção de grânulos de secreção, permite-nos seguir seu trajeto intracelular desde o complexo de Golgi, até ao citoplasma apical, onde os grânulos de secreção penetram no interior das microvilosidades e deslocam-se até ao seu ápice, destacando-se num processo tipicamente microapócrino (ver figura 21-A). Neste particular, os enterócitos de *H. suis* se assemelham aos de *Spodoptera frugiperda* e *Erinyis ello*, onde também se observa este mecanismo de secreção, no IMA e IMC (SANTOS et al., 1983; BOLOGNESI et al., 2001).

É um fato conhecido que os Anoplura, ou piolhos sugadores, vivem simbioticamente com microrganismos procariontes, alojados em células do sistema digestivo de machos e fêmeas e no sistema reprodutor das fêmeas, que recebem a denominação de micetócitos (SAXENA &



AGARWAL, 1985; VOLF, 1991; ZELAZOWSKA & BILINSKI, 1999). Além dos Anoplura, os micetócitos estão presentes em cupins e baratas (DOUGLAS, 1989; CHRISTIANSENWENIGER, 1994; FUKATSU et al., 1994; HONGOHO & ISHIKAWA, 1994; COSTA et al., 1995; SASAKI & ISHIKAWA, 1995; AKHTAR & VAN EMDEN, 1996; GRANDI et al., 1997) e em várias outras espécies de insetos (WAKU & ENDO, 1987; ABE et al., 1995; COSTA et al., 1996; KANTHETI et al., 1996; FUKATSU & NIKOH, 2000). Para muitos insetos, existe uma correlação entre a sobrevivência e a presença de simbioses no seu trato digestivo, providenciando uma reposição dos nutrientes perdidos durante o processo de alimentação, tais como vitaminas, esteróides e aminoácidos (WIGGLESWORTH, 1972; DADD, 1985; CHENG, 1986; HONGOHO & ISHIKAWA, 1994; ROMOSER & STOFFOLANO, 1994; AKHTAR & VAN EMDEN, 1996; FUKATSU & NIKOH, 1998).

Especificamente em *H. suis*, os enterócitos, além de suas funções digestivas normais, estão, algumas vezes, abrigando bactérias simbioses em seu citoplasma. Essas células, em resposta à presença dos simbioses, alteram seu microambiente celular para fornecer aos microrganismos, condições de sobrevivência. Nas fases iniciais de infestação (ver **Fig. 21-A**) quando a quantidade de bactérias é reduzida, a célula mostra características ultra-estruturais idênticas às das células não infectadas. Não foi possível identificar nenhuma membrana rodeando as bactérias individualmente, nesses primeiros momentos do micetócito. Mas quando um pequeno conjunto é formado, já é possível observar uma membrana de origem não determinada, limitando os simbioses dentro do citoplasma. Paralelamente ao aumento da quantidade de microrganismos no interior do citoplasma, a célula aumenta seu tamanho. Observa-se um incremento na quantidade de retículo endoplasmático granular e de mitocôndrias, indicando um substancial aumento da atividade metabólica da célula infectada, provavelmente para suprir as necessidades fisiológicas das bactérias. Esse fato é coincidente com os dados obtidos por vários autores, em

outras espécies de insetos (HINDE, 1970; HOUK & GRIFFITHS, 1980; AKHTAR & VAN EMDEN, 1996).

Conforme já mencionado, os micetócitos são células que abrigam bactérias simbiotes, não apenas no sistema digestivo (ALKHALIFA, 1984; BAUMANN & MORAN, 1997; GRANDI et al., 1997; BILINSKI & BUNING, 1998). Nas fêmeas de *H. suis*, os micetócitos são encontrados, além do IMA e IMC, também no ovário, indicando uma transmissão transovariana dos microrganismos simbiotes para as gerações subseqüentes (ZELAZOWSKA & BILINSKI, 1999), semelhante ao que ocorre em *Sciara ocellaris* (RIBEIRO & PERONDINI, 1991). Nos machos, a presença de micetócitos está restrita ao IM, especificamente ao IMA e IMC.

Nossos resultados mostram, claramente, a liberação de simbiotes na luz do IM, organizados num arranjo esférico e desprovido de citoplasma. O processo de liberação dos simbiotes para a luz parece ter início pela fusão da membrana citoplasmática, com a membrana que reveste o conjunto globoso de simbiotes. Gradualmente o citoplasma vai retraindo em direção basal, aumentando a abertura que vai, mais e mais, deixando a descoberto a massa esférica de simbiotes, até que esta é solta na luz. Essas bactérias permanecem agrupadas na luz do ventrículo, sem qualquer indício de membrana ou estrutura que mantenha sua agregação. Algumas dessas massas de bactérias mostram alterações, sugerindo que estejam sendo digeridas por enzimas luminais.

Como vimos, as células que alojam os simbiotes sofrem um processo de diferenciação e crescimento bastante acentuados. Mas, após a liberação dos simbiotes na luz do IM, observa-se a permanência do núcleo e das organelas na região basal da célula. A membrana citoplasmática, então, parece reconstituir a forma original do enterócito, num processo de completa regeneração, que inclui a reorganização das microvilosidades.

Como já abordado, um aspecto importante do sistema digestivo de insetos é o da compartimentalização da digestão. Sabemos que a maioria dos insetos possui membrana peritrófica (PETERS, 1992; TERRA, 2001), que é uma delicada malha de quitina e proteína, organizada na forma de um tubo na luz do IM. A luz do IM fica, então, dividida em um espaço endoperitrófico e outro ectoperitrófico. O primeiro é o espaço dentro do cilindro formado pela membrana peritrófica e o segundo, o espaço entre esta e o epitélio do tubo digestivo. Essa compartimentalização permite criar, no espaço ectoperitrófico, um contra-fluxo de água da região posterior para a anterior do IM, contrário ao fluxo ântero-posterior do alimento. Esse fluxo pósterio-anterior decorre da secreção de água pelas células do IMP e absorção no IMA, ou pelos cecos gástricos, quando presentes (SANTOS & TERRA, 1986; RIBEIRO et al., 1990; FERREIRA et al., 1993; JORDÃO et al., 1996).

Em algumas espécies, observa-se a substituição da membrana peritrófica por um gel, denominado gel peritrófico, que ocorre quando uma barreira altamente permeável é necessária entre o conteúdo luminal e a superfície do epitélio. O gel peritrófico é de difícil visualização pelas técnicas morfológicas convencionais, por se solubilizar facilmente durante o processamento do material. Pode ser percebido com uma pinça tocando a superfície luminal do epitélio, na forma de uma substância viscosa que adere à extremidade da pinça (TERRA, 2001).

As espécies das ordens Hemiptera e Thysanoptera, diferentemente da maioria dos insetos, não possuem membrana peritrófica. Ao invés disso, apresentam uma membrana denominada perimicrovilar (LANE & HARRISON, 1979; ANDRIES & TORPIER, 1982; FERREIRA et al., 1988; TERRA, 1990; SILVA et al., 1996). Essa membrana recobre as microvilosidades, mantendo uma pequena, mas constante, distância da membrana microvilar. Expande-se apicalmente para o compartimento luminal, onde termina em fundo cego, delimitando um compartimento fechado, denominado espaço perimicrovilar (TERRA, 1990). Assim como a

membrana plasmática, a membrana perimicrovilar também é lipoprotéica, mas quando comparada por criofratura com a membrana plasmática das microvilosidades, exibe poucas proteínas integrantes de membrana (LANE & HARRISON, 1979; ANDRIES & TORPIER, 1982). Parece ser formada a partir de vesículas secretoras com duas membranas, cuja membrana externa funde-se com a membrana microvilar e a interna com a perimicrovilar (SILVA et al., 1996). Sua origem parece estar vinculada aos ancestrais dos Hemiptera que se alimentavam de floema, pobre em aminoácidos. Assim, a perda de membrana peritrófica pode ter sido uma adaptação à ausência de digestão luminal, enquanto o surgimento de uma membrana perimicrovilar veio aumentar a capacidade de absorção de aminoácidos, presentes em pequena quantidade na dieta desses ancestrais (SILVA et al., 1996; TERRA, 1996).

Apesar da maioria dos insetos possuírem membrana peritrófica (ou perimicrovilar), existem alguns insetos que aparentemente não têm membrana peritrófica, tais como algumas formigas adultas (Hymenoptera), a maioria das mariposas e borboletas (Lepidoptera), pulgas (Siphonaptera), assim como espécies das ordens Psocoptera, Zoraptera, Strepsiptera, Raphidioptera, Megaloptera e inclusive alguns representantes já estudados da ordem Phthiraptera (PETERS, 1992; TERRA, 2001). No entanto, estes resultados negativos devem ser considerados com cautela, pois existe a possibilidade da membrana peritrófica ser secretada somente após a distensão do intestino pelo alimento, como em fêmeas de mosquitos hematófagos (RICHARDS & RICHARDS, 1977; TERRA, 2001), ou de existir um gel peritrófico. No caso de insetos adultos das ordens Hymenoptera e Lepidoptera, a perda da membrana peritrófica pode ser devida ao fato de sua dieta se constituir somente de substâncias de baixo peso molecular, tais como açúcares, que tornaram desnecessária a digestão luminal (TERRA, 2001).

Em *H. suis*, analisando imagens de ventrículos fixados alimentados, assim como em jejum, não detectamos a existência de membrana peritrófica ao nível histológico e ultra-estrutural, mesmo com o uso do WGA. Conforme anteriormente citado, o WGA, quando em presença de N-acetilglicosamina livre como competidor, é utilizado para evidenciar, especificamente, a quitina, um dos principais componentes da membrana peritrófica. Também não detectamos a presença de uma membrana perimicrovilar ou de uma estrutura semelhante ao gel peritrófico. Neste último caso, devido ao reduzido diâmetro do tubo digestivo do *H. suis*, por volta de 500 $\mu$ m, não foi possível ter acesso ao seu interior, para detectar, mecanicamente, a presença eventual de um gel peritrófico.

A aparente ausência de compartimentalização do ventrículo de *H. suis*, quer por membrana peritrófica ou gel peritrófico, quer por membrana perimicrovilar, é um achado surpreendente, uma vez que fica difícil imaginar um contato direto do alimento com o epitélio ventricular. Mas, mesmo que nossos achados morfológicos pareçam indicar a existência desse contato, a presença de um gel peritrófico não pode ser de todo descartada. Contudo, deve-se levar em consideração o fato de que o gel peritrófico parece ocorrer em insetos de ordens mais evoluídas, tais como em Bruchidae (TERRA, 2001), enquanto que *H. suis* pertence a uma ordem mais primitiva, Phthiraptera. Também relevante, é o fato da aparente ausência de membrana peritrófica em Hymenoptera e Lepidoptera, estar associada a uma dieta de baixo peso molecular, o que não é o caso de um hematófago como o *H. suis*.

É tentador especular que o sangue sugado por *H. suis* seja logo coagulado no seu interior. O coágulo formado manteria uma certa separação da superfície celular, imitando o material contido por um gel peritrófico ou membrana peritrófica. A digestão ocorreria paulatinamente a partir da superfície do coágulo sem, contudo, solubilizar as porções mais internas. É talvez significativo observar que Siphonaptera adultos (hematófagos) também parecem não ter membrana peritrófica. O fato de

certos hematófagos, como os mosquitos, possuem membrana peritrófica, talvez resulte de serem muito maiores que os Phthiraptera e Siphonaptera. Nesse caso, a relação superfície-volume do coágulo é inferior às das duas ordens citadas e o mosquito teria a digestão facilitada com compartimentalização e os fluxos intestinais referidos anteriormente.

Do ponto de vista do perfil enzimático encontrado, a discussão da atividade de enzimas digestivas no tubo digestivo de *H. suis*, deve partir da observação dos gráficos apresentados na **Fig. 22**. Nota-se a presença de quatro picos principais de atividade proteinásica sobre caseína FITC (picos 1, 2, 3 e 4). Realizando-se a mesma observação com o uso de CBZArgMCA e CBZPheArgMCA como substrato, verificamos a presença de dois e três picos principais de atividade, respectivamente, coincidentes com os picos observados na presença de caseína FITC. Aplicando-se o mesmo raciocínio para o gráfico obtido utilizando-se SAAPMCA como substrato, nota-se a presença de dois picos principais de atividade: um pico minoritário de atividade, coincidente com o primeiro pico de atividade sobre caseína FITC e outro maior, coincidente com o quarto pico de atividade sobre caseína FITC. Tais resultados sugerem que, dentre as enzimas responsáveis pela atividade proteinásica em *H. suis*, tripsina e quimotripsina são predominantes.

Com base nos dados apresentados na Tabela 1, é possível se afirmar que, em *H. suis*, há ocorrência predominante de formas solúveis de tripsina, embora os dados também sugiram a existência de formas de tripsina associadas a membranas (integrantes da membrana plasmática ou imobilizadas no glicocálix). A ocorrência de tripsina associada ao glicocálix foi verificada anteriormente por várias técnicas e corresponde, de regra, à fração de enzimas liberadas de membranas por ciclos de congelamento e descongelamento (TERRA & FERREIRA, 1994). Verifica-se também a presença de atividade nas frações obtidas após solubilização de membranas com CHAPS, indicando a ocorrência de tripsina integrante à membrana. JORDÃO et al., (1996), num estudo sobre secreção de

tripsina em larvas de *Musca domestica*, encontrou tanto formas solúveis quanto formas ligadas à membrana dessa serino-proteinase. Esses autores encontraram, através de técnicas de imunocitocalização, formas de tripsina associadas a vesículas de secreção, vesículas do complexo de Golgi, superfície das microvilosidades intestinais e no conteúdo luminal do intestino posterior de *M. domestica*.

De maneira similar, quimotripsina é provavelmente uma enzima solúvel, secretada para o lúmen do intestino médio pelas células do epitélio intestinal, uma vez que a sua maior atividade, está presente na fração solúvel. Verifica-se atividade enzimática de quimotripsina nas demais frações utilizadas neste estudo. Porém, considerando que essas atividades são bem menores quando comparadas com a atividade encontrada na fração solúvel, poderíamos supor que as mesmas seriam devidas à alguma contaminação ocorrida no momento da preparação das amostras. Entretanto, as atividades específicas apresentadas em todas as frações, são da mesma ordem de grandeza que a encontrada na fração solúvel. Assim sendo, talvez ocorram formas de quimotripsina solúvel e associadas à membrana, tal como parece ocorrer com tripsina.

*H. suis* apresenta atividade de cisteína proteinase solúvel e, curiosamente, as maiores atividades dessa proteinase ocorrem nos materiais correspondentes às frações de membrana do tubo digestivo. Tanto as atividades, quanto as atividades específicas, são maiores nas frações de membrana, sendo que, as maiores são encontradas na fração de proteínas integrantes S<sub>3</sub> (vide Tabela 1). TERRA & FERREIRA (1994) afirmam que cisteína proteinases são comuns em tubos digestivos de Hemiptera Heteroptera e que, em besouros da família Bruchidae, é a principal proteinase presente no intestino médio. *H. suis* pertence à Ordem Phthiraptera que, segundo algumas hipóteses de filogenia propostas para a Classe Insecta (BRUSCA & BRUSCA, 1990), está evolutivamente "aparentado" com os Hemiptera Heteroptera e, como consequência direta, esses grupos podem compartilhar características

entre si, e talvez uma dessas características possa ser a presença de cisteína proteinase entre as proteinases presentes no tubo digestivo. O aspecto interessante em *H. suis*, é o fato desse tipo de enzima estar associado às membranas, como sugerido pelos resultados encontrados. Futuramente, esse fato poderá ser investigado com maior profundidade. Deve-se acrescentar que cisteína proteinases, associadas à membranas, também foram encontradas em pulgões (Hemiptera:Homoptera), como por exemplo em *Acyrtosiphum pisum* e *Brevicorine brassicae* (CRISTOFOLETTI, RAHBÉ, SILVA e TERRA, informação pessoal).

Segundo os dados obtidos e apresentados na Tabela 1,  $\alpha$ -glicosidase se apresenta como uma enzima predominantemente solúvel (provavelmente secretada para o lúmen, pelo epitélio), ao passo que as atividades encontradas nos demais materiais, é quase desprezível em relação à atividade solúvel.

Aminopectidase é provavelmente uma enzima restrita a membranas, visto que, tanto sua atividade, como atividade específica, é maior nos solubilizados de membranas. A atividade solúvel encontrada pode ser devido a injúrias ocorridas no epitélio no processo de dissecação do material biológico, ou à descamação dos enterócitos.

Como vimos ao longo deste trabalho, a ordem Phthiraptera é constituída por um grupo de insetos, onde não existiam informações sobre a organização morfofuncional de seu processo digestivo. Pelos resultados apresentados, pudemos constatar que o sistema digestivo de um de seus representantes, o *H. suis*, apresenta características peculiares, que o destacam em relação às demais espécies conhecidas, pertencentes às outras ordens de insetos. Apesar de fazer parte de uma ordem próxima aos Hemiptera, não apresenta membrana perimicrovilar, uma possibilidade esperada, *a priori*. Também não mostra evidências da existência de uma membrana peritrófica típica, embora a ocorrência de um gel peritrófico não esteja descartada. Os enterócitos que compõem o



epitélio do tubo digestivo exibem um polimorfismo surpreendente, com células que vão da forma pavimentosa à colunar. A presença de micetócitos, células que abrigam bactérias simbiotes, que constituem uma adaptação dos enterócitos à infecção, foi um achado interessante no epitélio digestivo. Mas o interesse maior residiu no fato de ter sido possível acompanhar sua diferenciação e constatar que, após a eliminação das bactérias para a luz intestinal, as células terem, aparentemente, a capacidade de regeneração como enterócitos. A análise bioquímica do tubo digestivo revelou a existência de hidrolases digestivas importantes, destacando-se a tripsina, que são eliminadas, aparentemente, por um mecanismo de secreção microapócrino nas regiões anterior e mediana do ventrículo.

Acreditamos que o estudo detalhado do sistema digestivo deste grupo de insetos, aqui iniciado, reveste-se de uma grande importância, não apenas do ponto de vista econômico e médico-sanitário, por se tratarem de insetos parasitas de aves e mamíferos, incluindo o próprio homem, como do ponto de vista de conhecimento acerca das tendências evolutivas, relacionadas à evolução do sistema digestivo, existentes dentro dos insetos. Um desdobramento importante deste trabalho, no futuro, nos parece ser o estudo comparado do sistema digestivo de representantes de outros grupos de piolhos, como os das sub-ordens *Ischnocera* e *Amblycera*, que parasitam aves, inclusive de granjas, que apresentam morfologia e hábitos alimentares diversos dos de *H. suis*. Novos achados neste sentido podem levar a uma mudança ainda maior da visão hoje existente sobre a organização do fenômeno digestivo da ordem Phthiraptera.

**RESUMO**

Este trabalho apresenta um estudo detalhado do sistema digestivo do *Haematopinus suis* (Phthiraptera, Anoplura), num enfoque morfofuncional. Do ponto de vista anatômico, o tubo digestivo é constituído por um intestino anterior (IA), um intestino médio ou ventrículo (IM) e um intestino posterior (IP). O IA, após a cavidade bucal, é formado pelo esôfago e um proventrículo bastante dilatado. O IM continua-se a partir do proventrículo, com o mesmo diâmetro deste e, gradualmente, torna-se mais delgado. No terço final do abdômen, curva-se numa sinuosidade em forma de "s" e termina onde estão inseridos os túbulos de Malpighi. O IP segue num trajeto retilíneo, passando pela papila retal, reto e ânus.

Visto pela microscopia de luz, o IA é formado por um epitélio pavimentoso simples revestido por cutícula. Aproximadamente na região central do tórax, o epitélio forma uma evaginação que circunda todo o diâmetro do tubo, sem, contudo, caracterizar um esfíncter. A partir dessa evaginação inicia-se o IM, onde ocorrem os principais eventos da digestão. Nessa região do intestino, também formada por um epitélio simples, pode-se identificar apenas um tipo celular, o enterócito. Pela morfologia do epitélio, é possível subdividir o IM em 3 regiões: anterior, central e posterior. O intestino médio anterior (IMA) apresenta em seu epitélio, células altas, normalmente com extremidades afiladas, ladeadas por células de morfologia pavimentosa. No intestino médio central (IMC), encontramos células colunares, cúbicas (predominantes) e pavimentosas, enquanto que o intestino médio posterior (IMP) é recoberto por células predominantemente cúbicas.

O intestino posterior é constituído por epitélio cúbico simples recoberto por cutícula, que, na região da papila retal, torna-se pavimentoso.

Com a finalidade de evidenciar a possível presença de uma membrana peritrófica na luz do IM, cortes histológicos dessa região foram incubados com WGA ("wheat germ agglutinin") conjugado com fluoresceína, na presença de N-acetilglicosamina livre, tornando a reação específica para quitina. Quando observadas ao microscópio confocal,

essas preparações não mostraram uma reação de fluorescência significativa que pudesse ser indicativa da existência de uma membrana peritrófica estruturada. No entanto, não ficou descartada a existência de um gel peritrófico.

Observadas pela microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, as células do IM apresentam a superfície apical modificada na forma de microvilosidades bem diferenciadas. Não foi detectada a existência de uma membrana perimicrovilar similar à existente entre os Hemiptera. A membrana plasmática, nas suas superfícies laterais, estão unidas por junções septadas lisas e apresentam muitas interdigitações. A membrana plasmática basal exhibe, por sua vez, diversas invaginações, formando uma rede de canalículos com mitocôndrias associadas. No IMP, essa rede assume maior complexidade e apresenta um número ligeiramente superior de aberturas em direção à lâmina basal, podendo indicar um maior potencial de tomada, pelo epitélio, de íons e água a partir da hemolinfa. As mitocôndrias, arredondadas ou ovais, são grandes e abundantes. Embora sejam mais numerosas no citoplasma apical, localizam-se também no citoplasma basal, em associação com as invaginações da membrana plasmática. O núcleo tem forma freqüentemente oval. A carioteca circunscreve um nucleoplasma de baixa eletrondensidade, com alguns grumos pequenos de cromatina e um nucléolo bem evidente.

Com relação à atividade secretora do epitélio, observamos nas regiões IMA e IMC, uma grande quantidade de retículo endoplasmático granular, várias áreas de Golgi e grânulos de secreção brotando das extremidades das microvilosidades dos enterócitos, num processo de secreção do tipo microapócrino.

Alguns enterócitos do IMA e IMC, possuem bactérias simbiotes no interior do citoplasma, sendo denominados micetócitos. O crescimento das bactérias, leva a um aumento no tamanho das células e a alterações significativas na sua ultra-estrutura, particularmente com relação ao número de mitocôndrias, bastante maior, e a uma hipertrofia do retículo endoplasmático granular. Num estágio mais avançado de maturação,

parece ocorrer a fusão da membrana plasmática com a que reveste o conjunto de bactérias. Isso promove um gradual descobrimento das bactérias, que parecem ser eliminadas "in toto" para a luz intestinal, com a célula retornando à sua morfologia inicial.

A análise bioquímica de homogenados de tubos digestivos para detecção de hidrolases digestivas, mostrou a presença de tripsina, cisteína proteinase, aminopeptidase,  $\alpha$ -glicosidase e quimotripsina. A maior atividade enzimática foi detectada para tripsina, tendo sido evidenciadas formas solúveis e também associadas a membranas, o mesmo ocorrendo com cisteína proteinase. Já aminopeptidase é, provavelmente, restrita à membrana plasmática, enquanto que,  $\alpha$ -glicosidase e quimotripsina são predominantemente solúveis.

**ABSTRACT**

This work presents a detailed morpho-functional study of the *Haematopinus suis* (Phthiraptera, Anoplura) digestive system. In this species, the digestive tract consists of a foregut (IA), a midgut (IM) or ventriculus and a hindgut (IP). The IA begins in the bucal cavity and is formed by the oesophagus and a slightly dilated proventriculus. The IM begins in the proventriculus, with the same diameter, and becomes gradually thinner. In the final third of the abdomen the IM twists in s-shape ending in the region of insertion of the Malpighian tubules. The IP is a straight tube and is composed by the rectal pad, the rectum and the anus.

At the light microscopy level, the IA is made up of a simple squamous epithelium covered by a cuticle. Around the central region of the thorax, this epithelium forms an evagination which surrounds the whole tube diameter, without forming a sphincter. The IM begins from this evagination and it is considered the main site of digestion. The simple epithelium of these portion is formed by only one cell type, the enterocyte. According to the morphology of the epithelium, it is possible to subdivide the IM into 3 regions: anterior, central and posterior. The anterior midgut (IMA) presents tall cells, usually sharp edged, surrounded by cells with squamous morphology. In the central midgut (IMC), columnar, cuboidal and squamous cells are found, while the posterior midgut (IMP) is predominantly lined by cubic cells. The hindgut has a simple cubic epithelium, covered by a cuticle which, in the rectal pad region, becomes squamous.

In order to detect the possible presence of a peritrophic membrane in the IM lumen, histological sections of that region were incubated with WGA (wheat germ agglutinin) conjugated with fluorescein in the presence of excess free N-acetilglucosamine, which makes the reaction specific for chitin. When observed in the confocal microscope, such preparations did not show a significant fluorescence reaction which may indicate an absence of an organized peritrophic membrane. Nevertheless, the existence of a peritrophic gel cannot be discarded.

When observed by the transmission and scanning electron microscopes, the IM cells present an apical surface modified into well developed microvilli. The existence of a perimicrovillar membrane, similar to the one found among the Hemiptera, was not detected. In their lateral surfaces, the plasma membranes are linked by smooth septate junctions and present several interdigitations. The basal plasma membrane shows several infoldings forming a labyrinth of tubules with associated mitochondria. In the IMP this labyrinth becomes more complex and presents a slightly higher number of apertures toward the basal lamina what may indicate a greater potential of ions and water intake from the haemolymph. The mitochondria are large and abundant mainly in the apical cytoplasm. Mitochondria are also found in the basal cytoplasm, associated with the infoldings of the plasma membrane. The nucleus is usually oval in outline. The nuclear envelope surrounds an electron-lucid nucleoplasm with some small condensed regions of heterochromatin and a well defined nucleolus.

The IMA and IMC enterocytes present an intense secretory activity with well developed rough endoplasmic reticulum, several Golgi areas and secretory granules. These granules seems to pinch off from the tips of microvilli in a microapocrine secreting mechanism.

Some enterocytes of the IMA and IMC show symbiont bacteria in the cytoplasm. These cells are known in literature as mycetocytes. The increasing in the number of bacteria inside mycetocytes leads to an enlargement of these cells which show several ultrastructural alterations such as a greater number of mitochondria and rough endoplasmic reticulum elements. In later steps of mycetocytes differentiation, the bacteria are clearly surrounded by a membrane and the mitochondria are found in a peripheral arrangement between this membrane and the apical plasma membrane. In the final stages of differentiation, a fusion event occurs between these two membranes, releasing the bacteria "in toto" into the gut lumen. After the discharging of bacteria, the cells return to its original enterocyte morphology.



The biochemical analysis of digestive tube homogenate for the detection of digestive hydrolases revealed the presence of trypsin, cystein-proteinase, aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase and chymotrypsin. The more significant enzymatic activity was detected for trypsin, which is present in soluble forms and also associated to membranes, the same occurring with cystein-proteinase. On the other hand, aminopeptidase is probably restricted to plasma membrane while  $\alpha$ -glucosidase and chymotrypsin are predominantly soluble.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

De acordo com NBR-6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas: 2000.  
Abreviaturas de periódicos segundo BIOSIS Serial Sources. Philadelphia: 1999.

- ABE, Y.; MISHIRO, K.; TAKANASHI, M. Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia-stali* scott. **Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.**, v.39, p.109-115, 1995.
- AKHTAR, S.; VAN EMDEN, H.F. Ultrastructure of the symbionts and mycetocytes of bird cherry aphid *Rhopalosiphum padi*. **Tissue Cell**, v.26, n.4, p.513-522, 1994.
- \_\_\_\_\_.; VAN EMDEN, H.F. Effect of the systemic fungicide benomyl on the symbionts and mycetocytes of the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) reared on wheat plants **B. Entomol. Res.**, v.86, n.4, p.319-328, 1996.
- ALKHALIFA, M.S. The trans-ovarial transmission of symbionts in the grain weevil, *Sitophilus-granarius*. **J. Invertebr. Athol.**, v.44, n.1, p.106-108, 1984.
- ANDRIES, J.C.; TORPIER, G. An extracellular brush-border coat of lipid-membranes in the midgut of *Nepa-cinerea* (INSECTA, HETEROPTERA) - ultrastructure and genesis. **Biol. Cell**, v.46, n.2, p.195, 1982.
- APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.4, p.279-311.
- AVERY, J.; JAHN, R.; EDWARDSON, J.M. Reconstitution of regulated exocytosis in cell-free systems: a critical appraisal. **Ann. Rev. Physiol.**, v.61, p.777-807, 1999.
- AUMÜLLER, G.; WILHELM, B.; SEITZ, J. Apocrine secretion - fact or artifact? **Ann. Anat.**, v.181, n.5, p.437-446, 1999.
- BAUMANN, P.; MORAN, N.A. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. **Int. J. General Molec. Microbiol.**, v.72, n.1, p.39-48, 1997.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Ed. Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.1, p.242-251.
- BILLINGSLEY, P.F. The midgut ultrastructure of haematophagous insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.35, p.219-248, 1990.
- BILINSKI, S.M.; BUNING, J. Structure of ovaries and oogenesis in the snow scorpionfly *Boreus hyemalis* (Linne) (Mecoptera : Boreidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, v.27, n.4, p.333-340, 1998.
- BINNINGTON, K.C.; KEMP, D.H. Role of tick salivary glands in feed and disease transmission. **Adv. Parasitol.**, v.18, p.316-340, 1980.
- BOLOGNESI, R; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.47, p.62-75, 2001.
- BROUQUI, P. et al. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. **N. Engl. J. Med.**, v.340, n.3, p.184-189, 1999.
- BRUSCA, R.; BRUSCA, G. **Invertebrates**. Sunderland: Sinauer, 1990. p.922.
- BUXTON, P.A. **The louse**: an account of the lice which infest man, their importance and control. London: Edward, 1947. p.1-115.
- CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, v.24, p.19-40, 1999.

- CHAPMAN, R.F. Structure of the digestive system. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.4, p.165-211.
- CHENG, T.C. **General parasitology**. London: Academic Press, 1986. p.631-642.
- CHINERY, W.A.; AYITEY-SMITH, E. Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Nature**, v.265, p.366-367, 1977.
- CHRISTIANSENWENIGER, P. Morphological observations on the preimaginal stages of *Aphelinus varipes* (Hymenoptera - Aphelinidae) and the effects of this parasitoid on the aphid *Rhopalosiphum-padi* (Homoptera, Aphididae). **Entomophaga**, v.39, n.3, p.267-274, 1994.
- COSTA, H.S. et al. Morphological variation in *Bemisia* endosymbionts. **Protoplasma**, v.189, p.194-202, 1995.
- \_\_\_\_\_.; TOSCANO, N.C.; HENNEBERRY, T.J. Mycetocyte inclusion in the oocytes of *Bemisia argentifolii* (Homoptera, Aleyrodidae) **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.89, n.5, p.694-699, 1996.
- CRISTOFOLETTI, P.T.; TERRA, W.R. Specificity, anchoring and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor* (Coleóptera) midgut cells. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.29, p.807-819, 1999.
- \_\_\_\_\_.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **J. Insect Physiol.**, v.47, p.143-155, 2001.
- CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. **Publ. ACIESP**, v.44, n.4, p.28-49, 1985.
- DADD, R.H. Nutrition: organisms. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.4, p.313-390.
- DAVIS, D.P.; WILLIAMS, R.E. Influence of hog lice, *Haematopinus suis*, on blood components, behavior, weight-gain and feed-efficiency of pigs. **Vet. Parasitol.**, v.22, n.3, p.307-314, 1986.
- DOUGLAS, A.E. Mycetocyte symbiosis in insects. **Biol. Rev.**, v.64, p.409-434, 1989.
- DRANCOURT, M. BARTONELLA infections in humans. **Presse Med.**, v.28, n.8, p.435-439, 1999.
- DURDEN, L.A.; MUSSER, G.G. The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographic distributions. **Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.)**, v.218, p.90, 1994.
- EDMAN, J.; KALE, H.W. Host behavior: its influence on the feeding success of mosquitoes. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.64, p.513-516, 1971.
- ESPINOZA-FUENTES, F.P.; TERRA, W.R. Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. **Insect Biochem.**, v.17, p.809-817, 1987.

- FERREIRA, C. et al. Digestive enzymes in midgut cells, endo and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.26, p.299-313, 1994.
- \_\_\_\_\_.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara americana* and its physiological implications. **J. Insect Physiol.**, v.27, p.559-570, 1981.
- \_\_\_\_\_. et al. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma-membranes of *Rhodnius-prolixus* posterior midgut cells. **Insect Biochem.**, v.18, n.6, p.521, 1988.
- \_\_\_\_\_.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Ultrastructural and biochemical aspects of digestion in the imagoes of the fly *Rhynchosciara americana*. **Entomol. Exp. Appl.**, v.66, p.135-143, 1993.
- FUKATSU, T. et al. Phylogeny of cerataphidini aphids revealed by their symbiotic microorganisms and basic structure of their galls - implications for host-symbiont coevolution and evolution of sterile soldier castes. **Zool. Sci.**, v.11, n.4, p.613-623, 1994.
- \_\_\_\_\_.; NIKOH, N. Two intracellular symbiotic bacteria from the mulberry psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, n.10, p.3599-3606, 1998.
- \_\_\_\_\_.; NIKOH, N. Endosymbiotic microbiota of the bamboo pseudococcid *Antonina crawii* (Insecta, Homoptera). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.2, p.643-650, 2000.
- GOODING, R.H. Digestive process of haematophagous insects: a literature review. **Quaest Entomol.**, v.8, p.5-60, 1972.
- GRANDI, G.; GUIDI, L.; CHICCA, M. Endonuclear bacterial symbionts in two termite species: an ultrastructural study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.29, n.2, p.281-292, 1997.
- GREEN, C.R.; NOIROTTIMOTHEE, C.; NOIROT, C. Isolation and characterization of invertebrate smooth septate junctions. **J. Cell Sci.**, v.62, p.351-370, 1983.
- HECKER, H. Structure and function of the midgut epithelial cells in *Culicidae mosquitoes* (Insecta, Diptera). **Cell Tissue Res.**, v.184, p.321-43, 1977.
- HINDE, R. Structural and physiological studies of the micetome symbiotes of aphids. **J. Insect Physiol.**, v.17, p.1791-1800, 1970.
- HOFFMAN, D.R. Allergic reactions to biting insects. In: LOCKEY, R.F. **Monograph of insect allergins**. Milwaukee: Levine, 1995. p.99-108.
- HONGO, Y.; ISHIKAWA, H. Changes of mycetocyte symbiosis in response to flying behavior of alate aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Zool. Sci.**, v.11, p.731-735, 1994.
- HOUK, E.J.; GRIFFITHS, G.W. Intracellular symbiotes of the homoptera. **Ann. Rev. Entomol.**, v.25, p.161-187, 1980.
- HOUSE, H. L. **Insect digestion: physiology of insecta**. New York: Academic Press, 1964. p.815-858.
- JONES, D. The neglected saliva: medically important toxins in the saliva of human lice. **Parasitology**, v.116, p.73-81, 1998. Supplement S.

- JORDÃO B. P. et al. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v.26, p.337-346, 1996.
- \_\_\_\_\_. et al. C. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **J. Insect Physiol.**, v.45, n.1, p.29-37, 1999.
- JOURDAIN, P. et al. Bartonella quitana: aortic localization and mitral abscess. **Arch. Mal. Coeur Vaiss.**, v.91, n.10, p.1271-1275, 1998.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; SILVA, M.D.A.; TORLONI, H. A simple procedure to obtain one-micrometer sections of routinely embedded parafin material. **Stain Technol.**, v.64, p.39-42, 1989.
- \_\_\_\_\_.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.
- KANTHETI, P.; JAYARAMA, K.S.; CHANDRA, H.S. Developmental analysis of a female-specific 16S rRNA gene from mycetome-associated endosymbionts of a mealybug, *Planococcus lilacinus* **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.26, n.10, p.997-1009, 1996.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v.27, n.2, p.137, 1965.
- KING, R.C.; AKAI, H. **Insect ultrastructure**. New York: Plenum, 1982. v.1.
- LANE, N.J. Insect intercellular junctions: their structure and development. In: KING, R.C.; AKAI, H. **Insect Ultrastructure**. New York: Plenum, 1984. v.1, p.402-433.
- \_\_\_\_\_.; CARTER, Y.R.; ASHBURNER, M. Puffs and salivary gland function: the fine structure of the larval and prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Wilhelm Roux's Archiv. Dev. Biol.**, v.169, p.216-238, 1972.
- \_\_\_\_\_.; HARRISON, J.B. Unusual cell-surface modification - double plasma-membrane. **J. Cell Sci.**, v.39, p.355-372, 1979.
- \_\_\_\_\_.; SKAER H.I. Intercellular junctions in insects tissues. **Adv. Insect Physiol.**, v.15, p.43-54, 1980.
- \_\_\_\_\_.; DILWORTH, S.M. Isolation and biochemical-characterization of septate junctions - differences between the proteins in smooth and pleated varieties. **J. Cell Sci.**, v.93, p.123-131, 1989.
- LEVOT, G. Resistance and control of lice on humans and production animals. **Int. J. Parasitol.**, v.30, n.3, p.291-297, 2000.
- LYAL, C.H.C. A cladistic analysis and classification of *Trichodectid mammal* lice (Phthiraptera, Ischnocera). **Bull. Br. Mus. (Nat. His.)**, v.51, n.3, p.187-346, 1985.
- MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRAŃAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: KING, R.C.; AKAI, H. **Insect ultrastructure**. New York: Plenum, 1984. v.2, p.199-261.
- MOLLENHAUER, H.H.; MORRE, D.J. Structure of golgi-apparatus. **Protoplasma**, v.180, n.1, p.14-28, 1994.

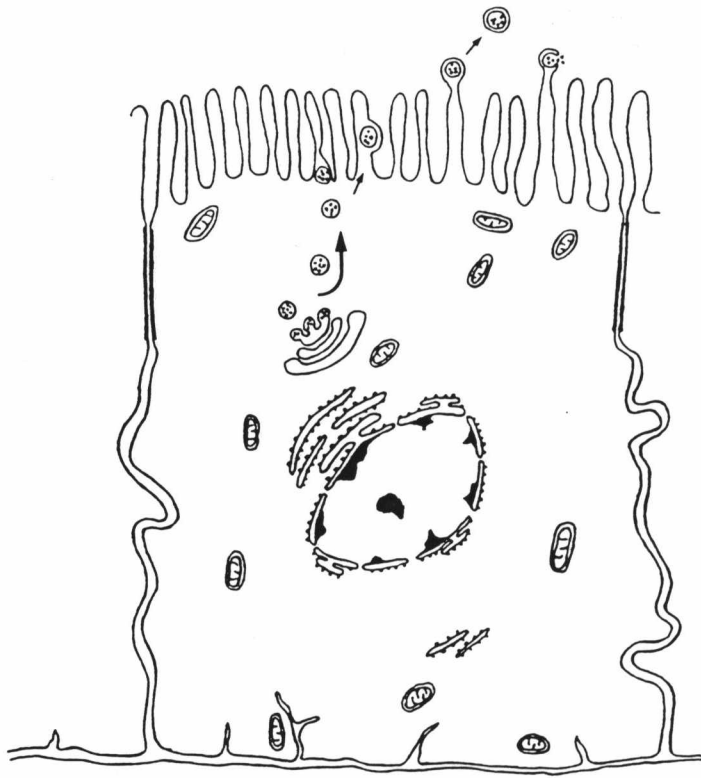
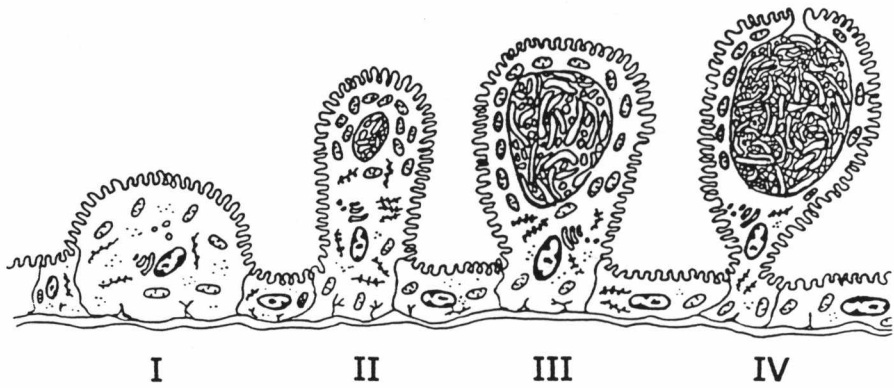
- MOURA, K.R.S. **Estudo morfofuncional da glândula salivar de *Biomphalaria straminea* (Mollusca, Planorbidae)**, 2001. Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- MUMCUOGLU, K.Y. et al. Localization of immunogenic antigens on midgut of the human body louse *Pediculus humanus humanus* (Anoplura, Pediculidae). **J. Med. Entomol.**, v.33, n.1, p.74-77, 1996.
- NIANG, M; BROUQUI, P; RAOULT, D. Epidemic typhus imported from Algeria. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, n.5, p.716-718, 1999.
- NOBLE, E.R. **Parasitology: the biology of animal parasites**. 5. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p.339-345.
- OCHANDA, J.O. et al. Characterization of body louse midgut proteins recognized by resistant hosts. **Med. Vet. Entomol.**, v.10, p.35-38, 1996.
- PAGE, R.D.M. Parallel Phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. **Cladistics**, v.10, p.155-173, 1994.
- \_\_\_\_\_. et al. Phylogeny of *Geomydoecus* and *Thomomydoecus* Pocket Gopher lice (Phthiraptera, Trichodectidae) and first instar morphology. **Syst. Entomol.**, v.20, p.129-143, 1995.
- PETERS, W. **Peritrophic membranes**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 238p.
- \_\_\_\_\_.; LATKA, I. Electron-microscopic localization of chitin using colloidal gold labeled with wheat-germ-agglutinin. **Histochemistry**, v.84, n.2, p.155-160, 1986.
- PIRCH, J.; GREVEN, H. Fine-structure of the midgut and the hindgut in *Echiniscus-testudo doyere* (Heterotardigrada). **Zool. Anz.**, v.232, n.5-6, p.161-175, 1994.
- PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in *Calliphora erythrocephala*. **J. Ultrastruct. Res.**, v.36, p.783-805. 1971.
- RAOULT, D. et al. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, n.2, p.434-436, 1999.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v.17, p.208-212, 1963.
- RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. Morphological basis of insect digestion. In: **Comprehensive physiology**. Basel: Karger, 1990. v.5, p.96-105.
- \_\_\_\_\_.; PERONDINI, A.L.P. Symbiont bacteroids in eggs and germ cells of *Sciara ocellaris* (Diptera, Sciaridae). **Invert. Reprod. Develop.**, v.19, n.2, p.123-129, 1991.
- \_\_\_\_\_.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Immunocytochemistry of digestive enzymes in enterocytes of insects: mechanisms of secretion. **Microsc. Acta**, v.5, p.43-45, 1996.
- RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Ann. Rev. Entomol.**, v.32. p.463-478, 1987.
- \_\_\_\_\_. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Diseases**, v.4, p.143-152, 1995.

- \_\_\_\_\_.; ROSSIGNOL, A.; SPIELMAN, A. Role of mosquito saliva in blood vessel location. **J. Exp. Biol.**, v.108, p.1-7, 1984.
- RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophics membranes of insects. **Rev. Entomol.**, v.22, p.219-240, 1977.
- ROBERTS, RH. Studies on control of hog louse *Haematopinus*. **J. Entomol.**, v.58, n.2, p.378, 1965.
- ROMOSER, W.S.; STOFFOLANO Jr., J.G. **The science of entomology**. 3. ed. Dubuque: Wm. C. Brown, 1994.
- ROSS, H.H.; ROSS, C.A.; ROSS, J.P.R. **A textbook of entomology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1982. p.666.
- RYDKINA, E.B. et al. *Bartonella quintana* in body lice collected from homeless persons in Russia. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, n.1, p.176-178, 1999.
- SANTOS, C.D.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **J. Insect Physiol.**, v.29, p.707-714, 1983.
- \_\_\_\_\_.; TERRA, W.R. Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis elio* caterpillar and inferences concerning secretory mechanism and the permeability of the peritrophic membrane. **Insect Biochem.**, v.16, p.691-700, 1986.
- SASAKI, T.; ISHIKAWA, H. Production of essential amino-acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **J. Insect Physiol.**, v.41, n.1, p.41-46, 1995.
- SATO, T.; SHAMOTO, M. A simple rapid polycrome stain for epoxy-embedded tissue. **Stain Technol.**, v.48, p.223-227, 1973.
- SAXENA, A.K. ; AGARWAL, G.P. Mycetocytes in *Aegypocus perspicuus* (Phthiraptera). **Curr. Sci. India**, v.54, n.15, p.763-764, 1985.
- SCHUMAKER, T.T.S.; CRISTOFOLETTI, P.T.; TERRA, W.R. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae, Meliponinae) larvae. **Apidologie**, v.24, p.3-17, 1993.
- SEGAWA, A. Serous and mucose granule exocytosis visualized in living salivary glands. **J. Dent. Res.**, v.77, p.905-905, 1998.
- SILVA, C.P. et al. Organization and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. **J. Insect Physiol.**, v.41, p.1093-1103, 1996.
- SMITH, V.S. Avian louse phylogeny (Phthiraptera, Ischnocera): a cladistic study based on morphology. **Zool. J. Linn. Soc.**, v.132, n.1, p.81-144, 2001.
- SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultrastruct Res.**, v.26, p.31-43, 1969.
- STAEHELIN, L.A. Structure and function of intercellular junctions. In: BOURNE, G.H.; DANIELLI, J.F. **Int. Rev. Cytol.** New York: Academic Press, 1974. v.39, p.191-283.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated Spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v.216, p.173-174, 1967.



- TERRA, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.21, p.675-734, 1988.
- \_\_\_\_\_. Evolution of digestive systems of insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.35, p.181-200, 1990.
- \_\_\_\_\_. Evolution and function of insect peritrophic membrane. **Front. Braz. Res.**, v.48, p.5-6, 1996.
- \_\_\_\_\_. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.47, p.47-61, 2001.
- \_\_\_\_\_.; FERREIRA C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.109B, p.1-62, 1994.
- THREADGOLD, L.T. **The ultrastructure of the animal cell**. Oxford: Pergamon Press, 1976.
- TREHERNE, J.E. Absorption from the gut of insects: review. **Viewp. Biol.**, v.1, p.201-241, 1962.
- VOLF, P. Postembryonal development of mycetocytes and symbionts of the spiny rat louse *Polyplax-spinulosa*. **J. Invertebr. Pathol.**, v.58, n.1, p.143-146, 1991.
- WAKU, Y.; ENDO, Y. Ultrastructure and life cycle of the symbionts in a homopteran insect *Anomoneura mori* Schwartz (Psyllidae). **Appl. Entomol. Zool.**, v.22, p.630-637, 1987.
- WATERHOUSE, D.F. Digestion in insects: review. **Ann. Rev. Entomol.**, v.2, p.1-18, 1957.
- WEISS, L. **Histology**. New York: Elsevier, 1983.
- WELSCH, U. et al. Cutaneous glands of male and female impalas (*Aepyceros melampus*): seasonal activity changes and secretory mechanisms. **Cell Tissue Res.**, v.292, n.2, p.377-394, 1998.
- WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology**. 7. ed. London: Chapman and Hall, 1972. p.476-552.
- WILHELM, B. et al. Cytoplasmic carbonic anhydrase II of rat coagulating gland is secreted via apocrine export mode. **J. Histochem. Cytochem.**, v.46, n.4, p.505-511, 1998.
- WIRTZ, H.P. Quantitating histamine in the saliva and salivary glands of two palearctic blackfly species (Diptera, Simuliidae). **Trop. Medic. Parasitol.**, v.39, p.309-312, 1988.
- YOSHIKOSHI, K.; KO, Y. Ultrastructure of the midgut cells of some parasitic copepods with special reference to the secretion of digestive enzymes. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.57, n.6, p.1071-1078, 1991.
- ZELAZOWSKA, M.; BILINSKI, S.M. Distribution and transmission of endosymbiotic microorganisms in the oocytes of the pig louse, *Haematopinus suis* (Insecta, Phthiraptera) **PROTOPLASMA**, v.209, n.3-4, p.207-213, 1999 .

**FIGURAS**

**A****B**

I

II

III

IV



V

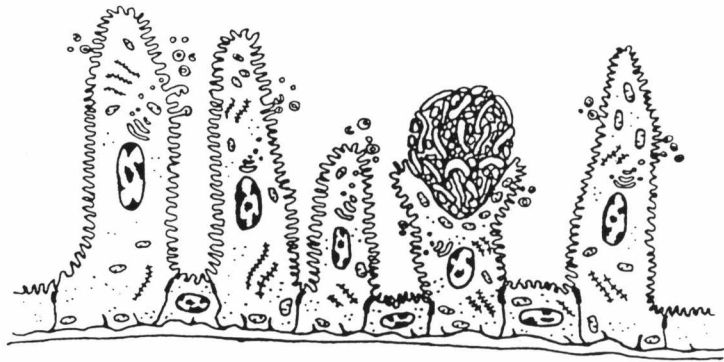
VI

VII

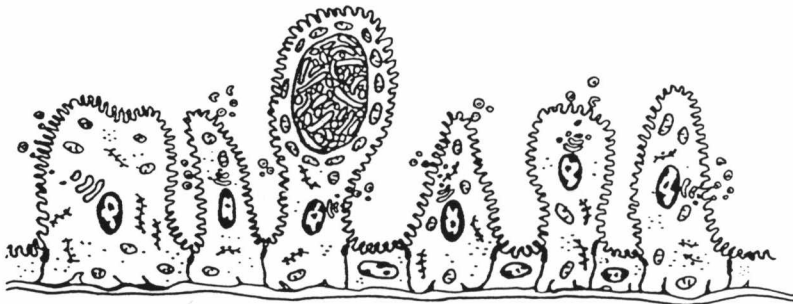
## Figura 24

- A** - Esquema diagramático mostrando a via de secreção microapócrina, desde o complexo de Golgi, até a eliminação das vesículas secretoras pelas extremidades das microvilosidades.
- B** - Esquema diagramático, mostrando as várias fases de formação do micetócito. I: Enterócito normal. II: Presença de poucas bactérias rodeadas por membrana, já caracterizando um micetócito. III: Aumento do número de bactérias, com deslocamento do restante do citoplasma para a periferia do micetócito. IV: Estágio avançado de diferenciação do micetócito, onde a membrana plasmática funde-se com a que reveste as bactérias, para sua liberação na luz do intestino. V e VI: Retração do citoplasma para liberação das bactérias. VII: Retorno aparente à forma original de enterócito.

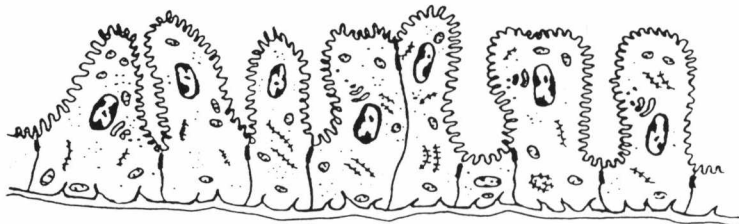
A



B



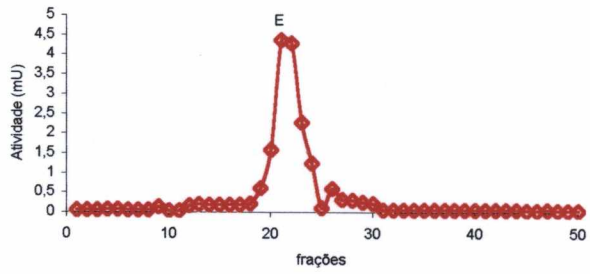
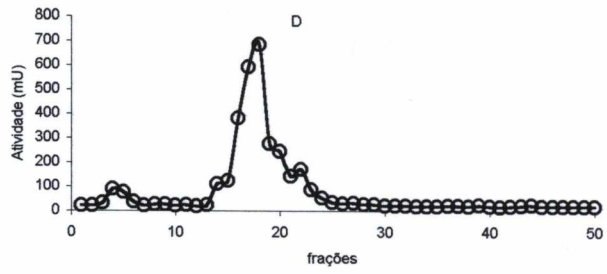
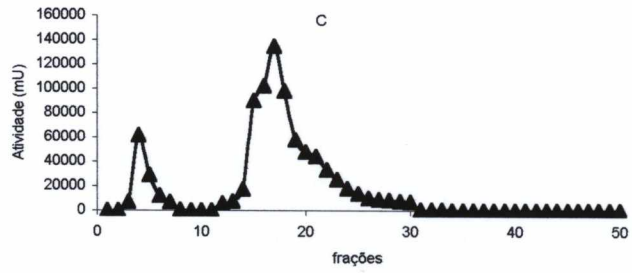
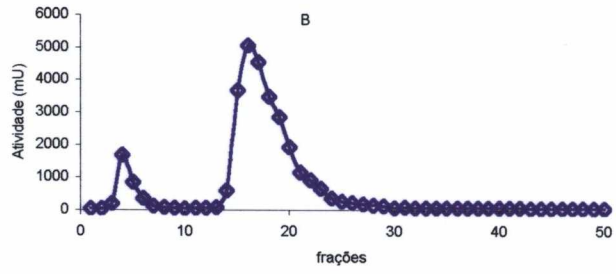
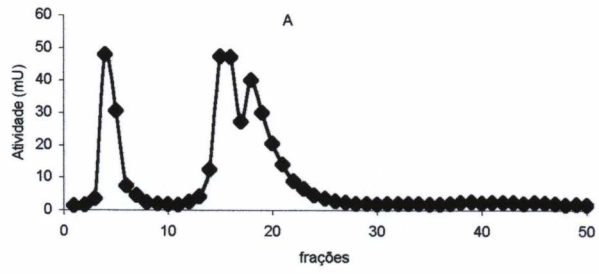
C



## Figura 23

Esquema representando a morfologia celular predominante em cada uma das três regiões do intestino médio.

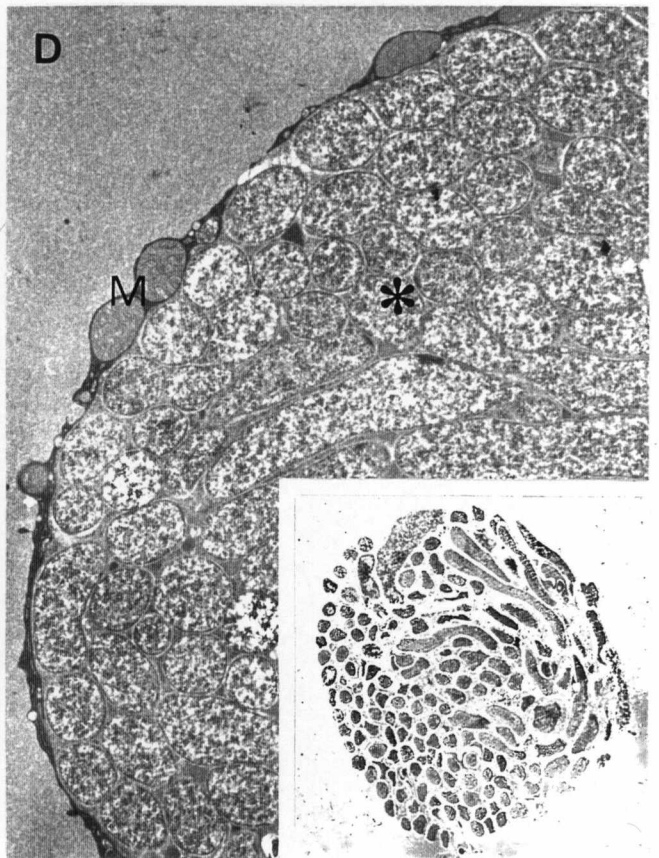
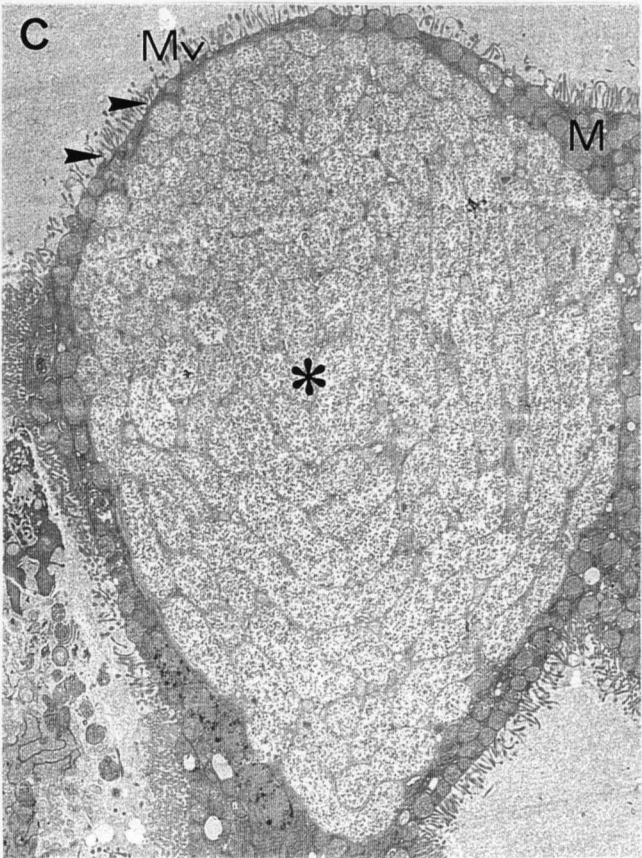
- A** - representa o intestino médio anterior-IMA, com o predomínio de enterócitos de morfologia predominantemente colunar. Mictócitos podem ser localizados facilmente nesta região.
- B** - representa o intestino médio central-IMC, com as células assumindo morfologia bastante variada.
- C** - representa o intestino médio posterior-IMP, onde a morfologia celular predominante é a cúbica. Aqui não temos a presença de mictócitos, nem de grânulos de secreção.



## Figura 22

Cromatografia de troca iônica em sistema de baixa pressão em coluna High Q (Econo System – Bio Rad) do material S<sub>1</sub> de *H. suis*. Os substratos utilizados foram: A: Caseína FITC; B: CBZArgMCA; C: CBZPheArgMCA; D: SAAPMCA; E: MU<sub>α</sub>glu.



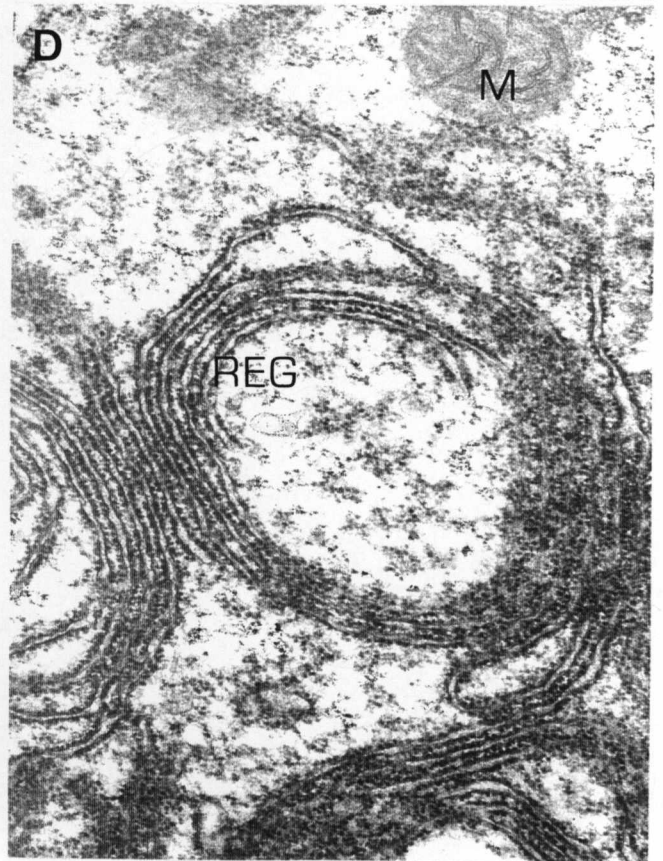
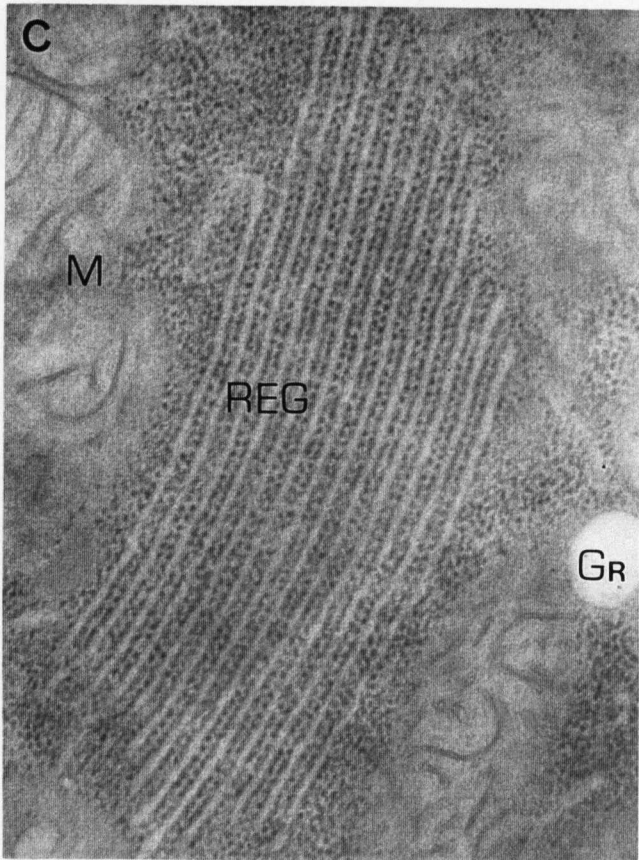
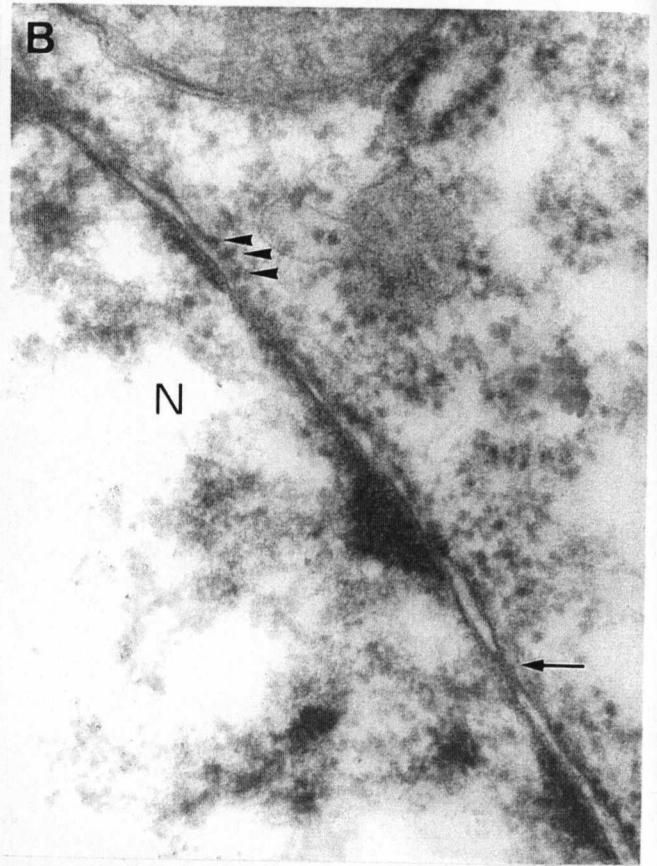
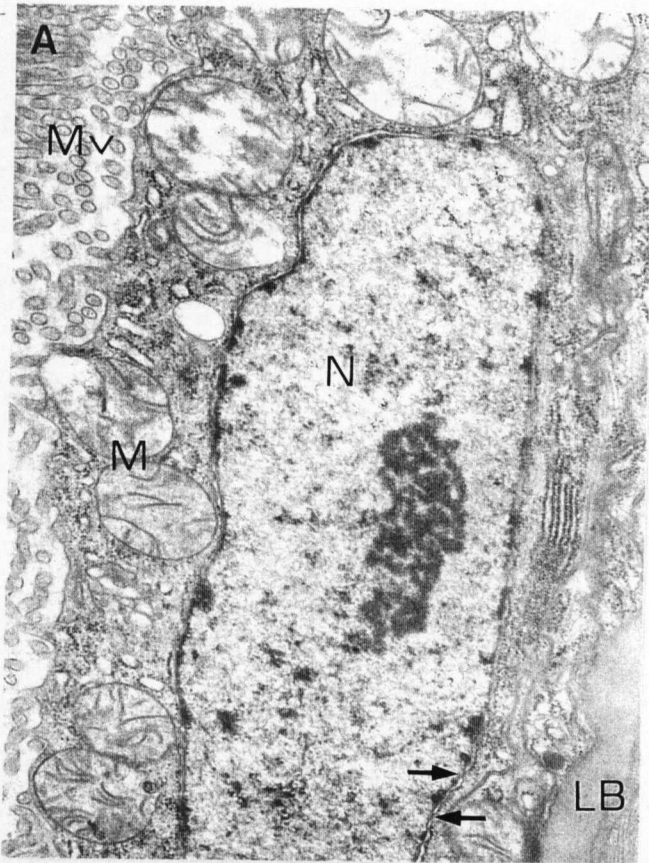


## Figura 21

- A** - Eletromicrografia do IMA mostrando na sua região superior, enterócitos. Na região inferior da imagem, vemos um micetócito em estado inicial de desenvolvimento. Notar acúmulo de bactérias no interior do citoplasma. X2500.
- B** - Região do epitélio do IMC, caracterizado pela heterogeneidade de formas celulares. Destaque para um micetócito em estado avançado de desenvolvimento, onde a maior parte do conteúdo celular é representado pelas bactérias simbiotes. X2300.
- C** - IMA. Micetócito nos estágios finais de desenvolvimento. O grande volume das bactérias simbiotes leva a um estreitamento do citoplasma circundante. X3800.
- D** - IMC. Detalhe de um micetócito. A cobertura citoplasmática consiste agora de uma tênue lâmina, de onde as últimas mitocôndrias estão sendo expulsas. X5800.

Detalhe: Bactérias simbiotes na luz do tubo digestivo, com indícios de estarem sujeitas a um processo digestivo. X2000.

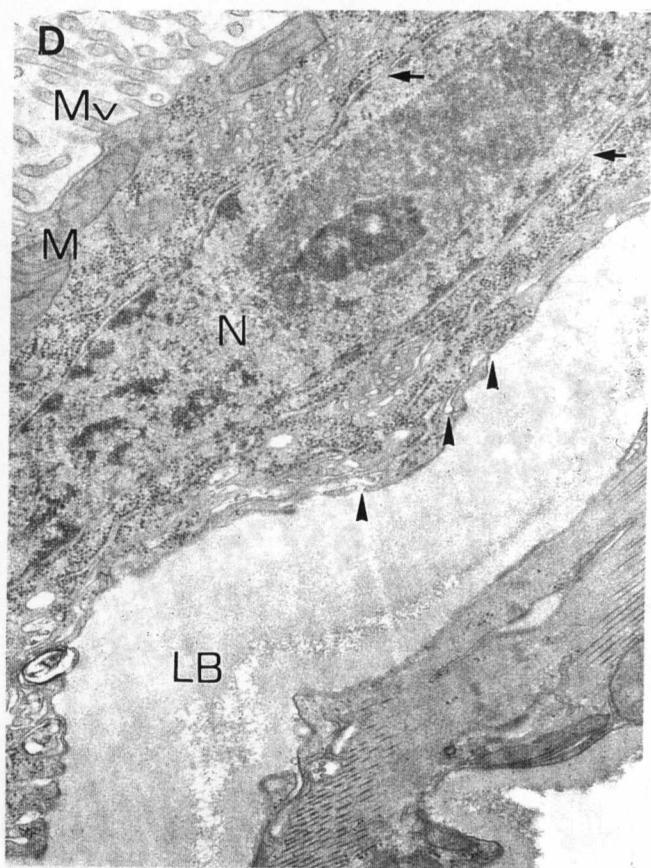
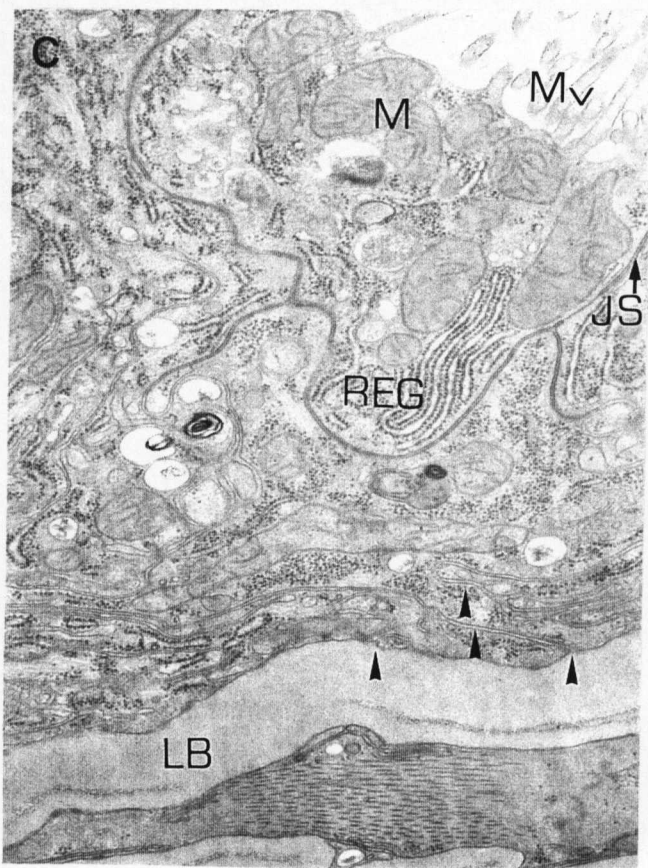
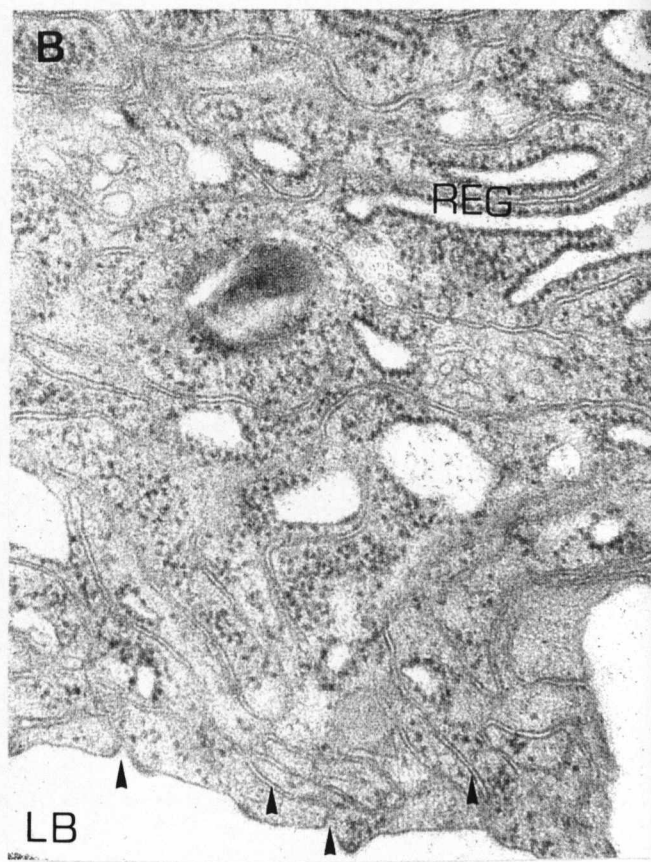
Bactérias simbiotes (asteriscos). Enterócitos (E). Luz (L). Microvilosidades (Mv). Mitocôndrias (M). Citoplasma remanescente (cabeças de seta).



## Figura 20

- A** - Enterócito do IMC. Destaque para o núcleo alongado, onde podemos ver os poros e ribossomos ligados à membrana externa da carioteca. X22500.
- B** - Detalhe do núcleo de um enterócito do IMC. Nota-se a carioteca, com ribossomos ligados à sua membrana externa e os poros nucleares. X94000.
- C** - IMC. Cisternas do REG organizadas paralelamente. X56000.
- D** - IMA. Cisternas do REG com organização semelhante a novelo. X37500.

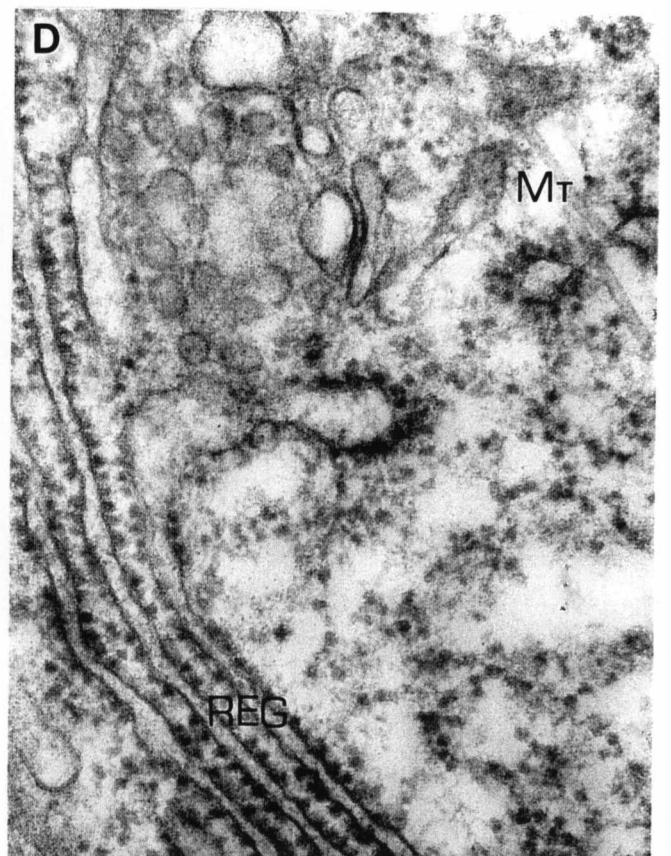
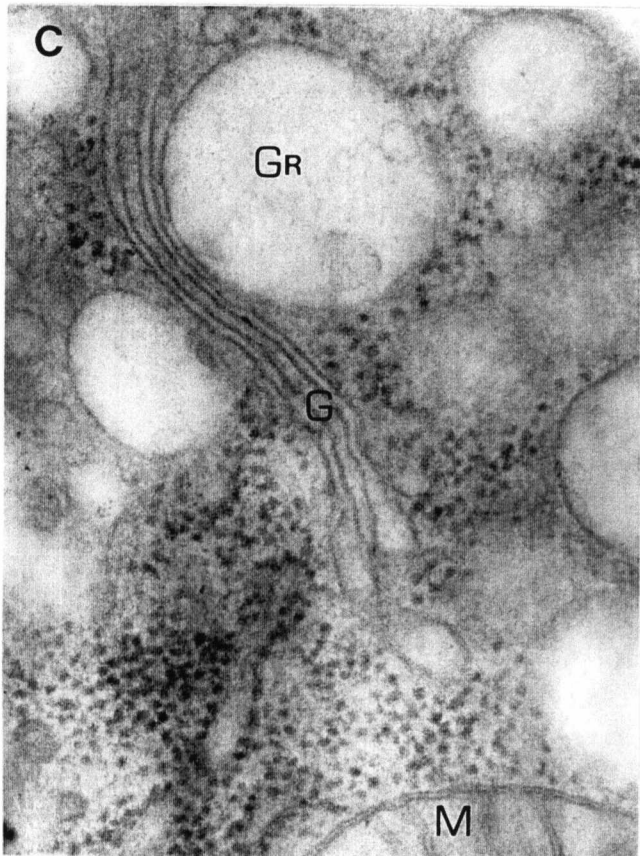
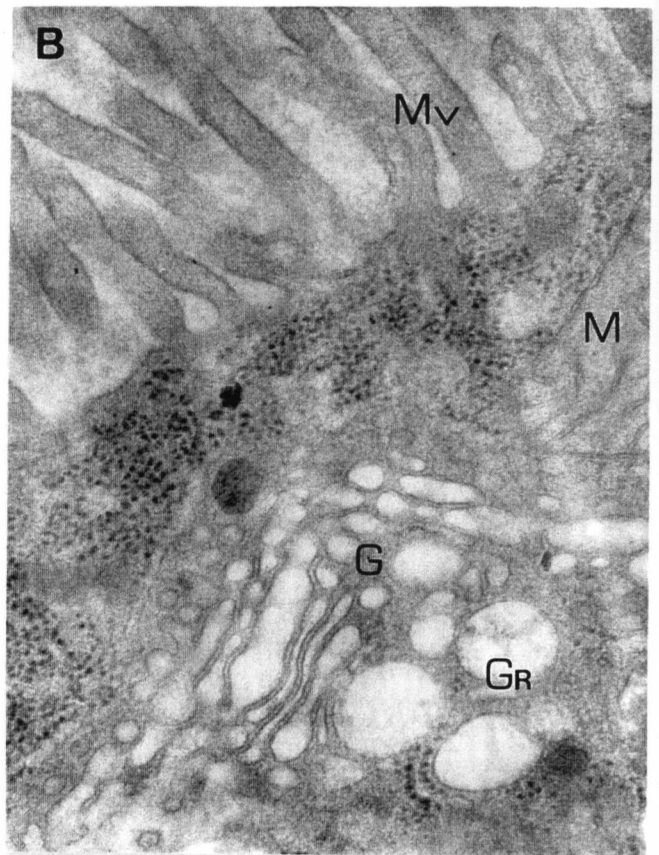
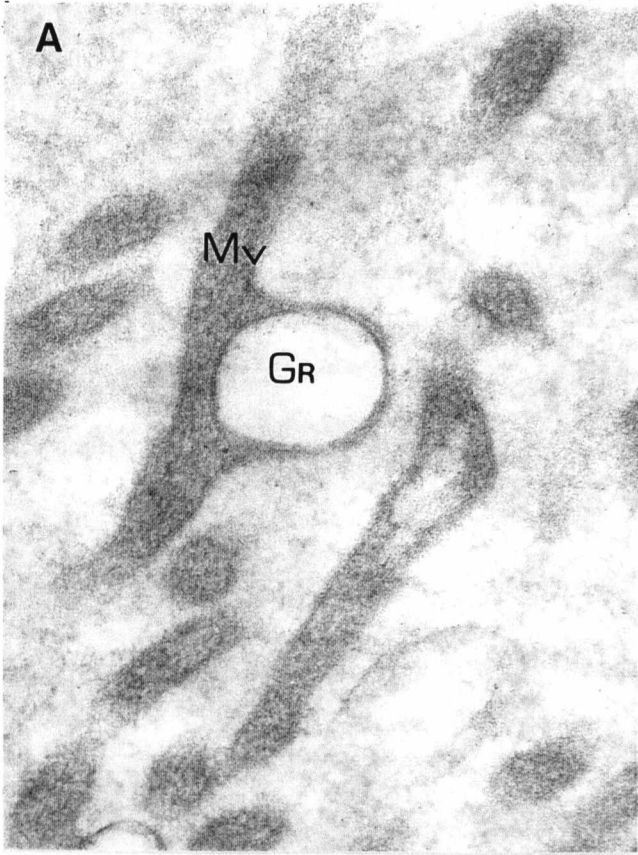
Grânulo de secreção (Gr). Mitocôndrias (M). Microvilosidades (Mv). Núcleo (N). Poro nuclear (seta). Retículo endoplasmático granular (REG). Lâmina basal (LB).



## Figura 19

- A** - IMA. Rede de invaginações da membrana plasmática basal. X28000.
- B** - Região basal de enterócito do IMA. Observar as invaginações da membrana plasmática basal. X36000.
- C** - Enterócito do IMA onde se destacam, na região apical, a junção septada lisa e, na basal, os estreitos canais que se formam a partir das invaginações da membrana plasmática. X22500.
- D** - Neste enterócito do IMC, observamos o núcleo alongado, onde é possível perceber os poros nucleares. Notamos também alguns canais, formados a partir das invaginações da membrana plasmática basal. X22500.

Invaginações da membrana plasmática basal (cabeças de seta). Junção septada lisa (JS). Microvilosidades (Mv). Núcleo (N). Poro nuclear (seta). Mitocôndrias (M). Retículo endoplasmático granular (REG). Lâmina basal (LB).



## Figura 18

**A** - IMC. Grânulo de secreção dentro de microvilosidade. X108000.

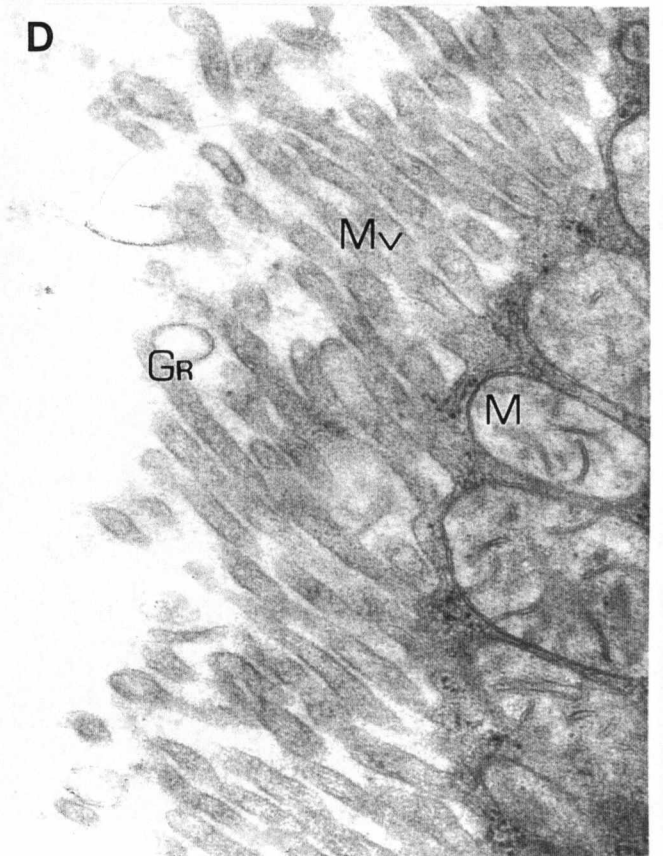
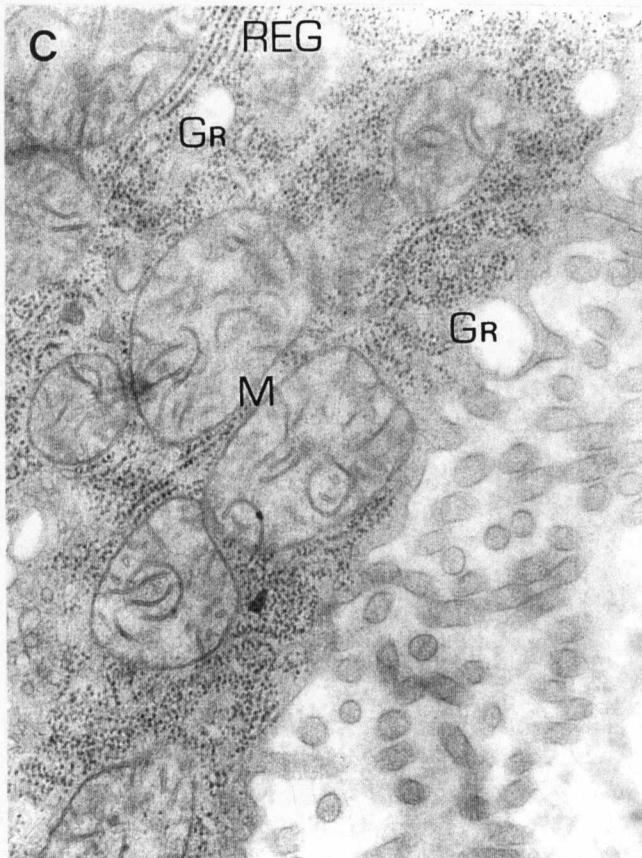
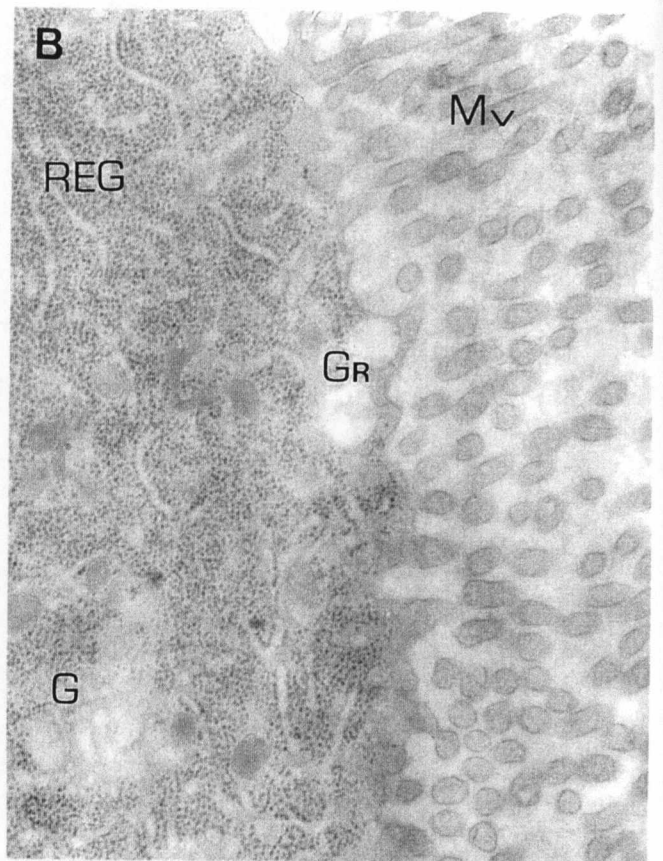
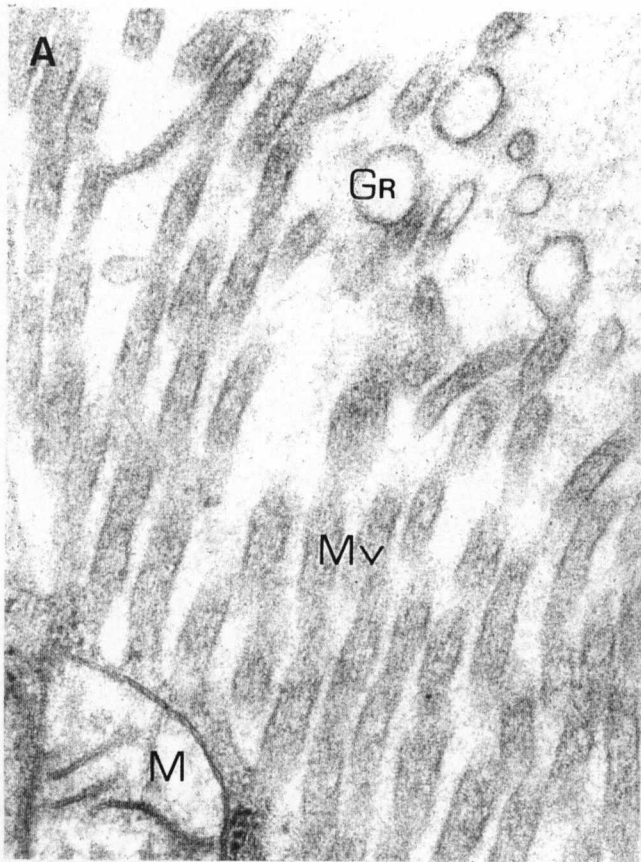
**B** - IMC. Complexo de Golgi, grânulos de secreção e microvilosidades. X52000.

**C** - IMA. Também aqui podemos observar um complexo de Golgi. Grânulo de secreção e parte de uma mitocôndria. X95500.

**D** - IMC. Cisternas do REG e microtúbulos. X94000.

Complexo de Golgi (G). Grânulos de secreção (Gr). Mitocôndrias (M).  
Microvilosidades (Mv). Microtúbulos (Mt). Retículo endoplasmático granular (REG).

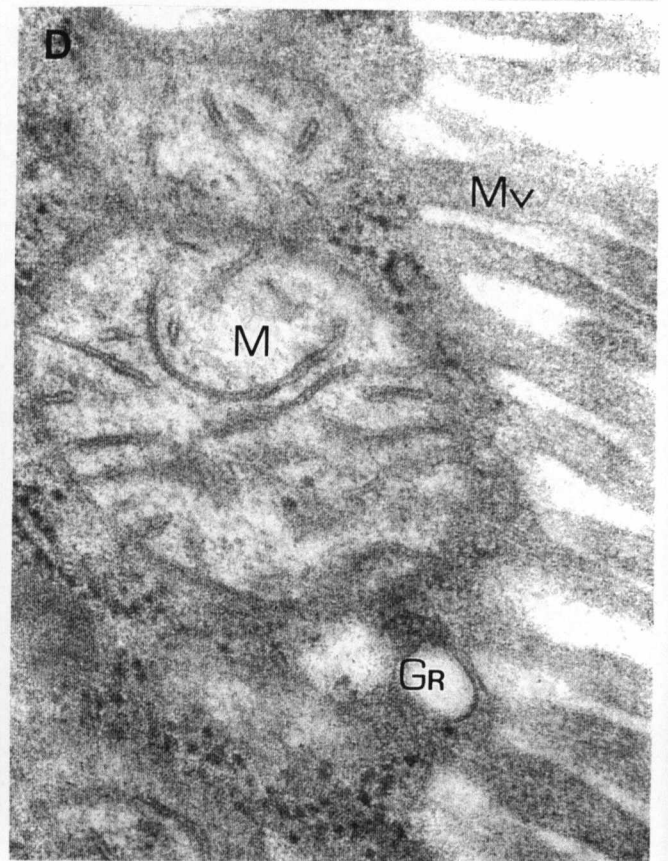
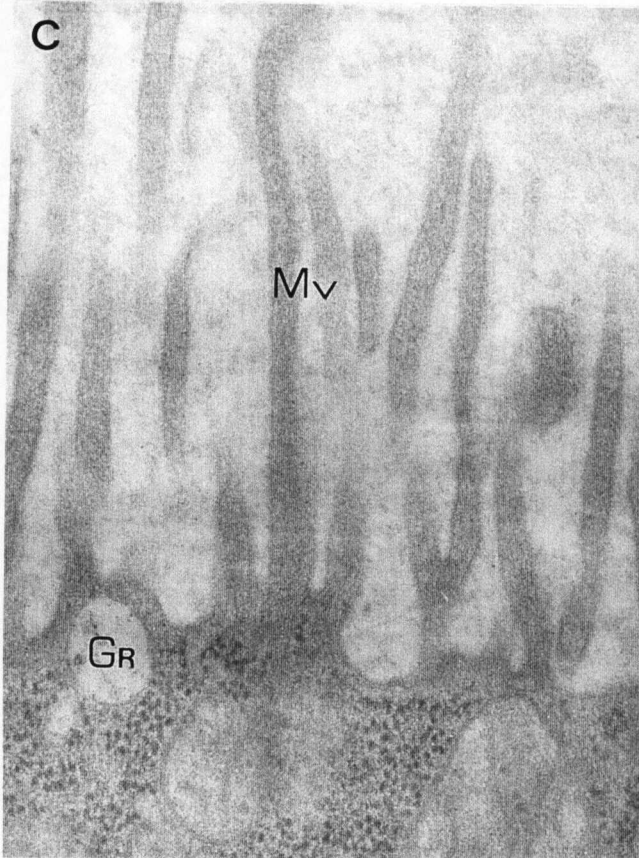
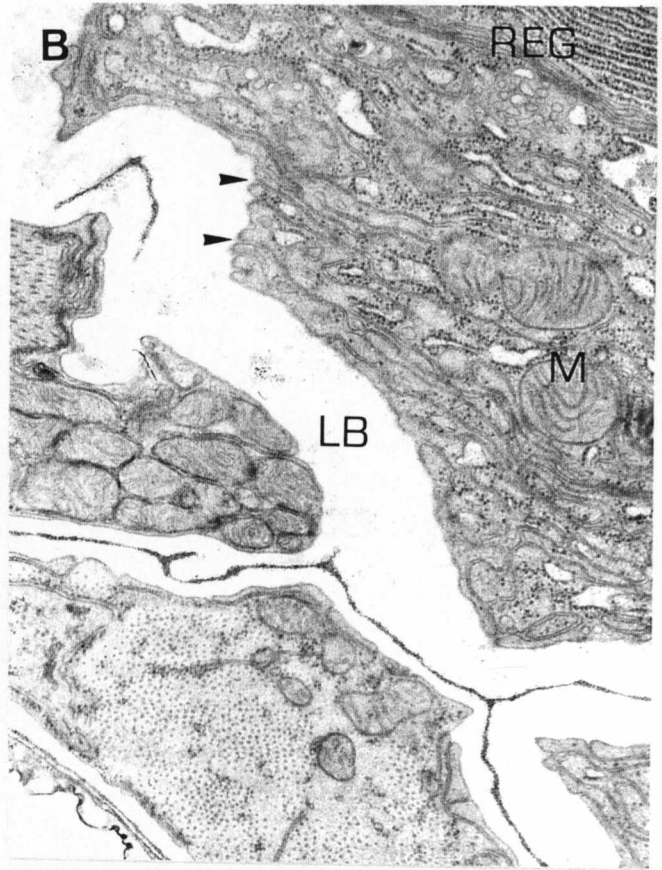
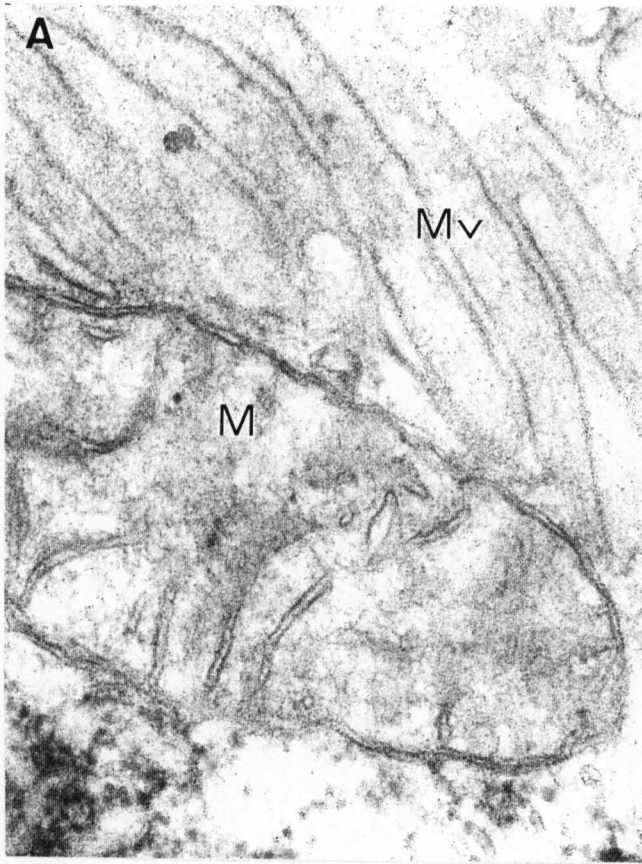




## **Figura 17**

- A** - IMC. Grânulos de secreção no ápice de microvilosidades. X68000.
- B** - IMA. Grânulos de secreção na base de microvilosidades. Notamos a presença de um complexo de Golgi. X36500.
- C** - IMC. Grânulos de secreção. Mitocôndrias. Cisternas de REG. X36000.
- D** - IMA. Grânulo circunscrito por membrana no ápice de microvilosidade. X50000.

Grânulos de secreção (Gr). Mitocôndrias (M). Retículo endoplasmático granular (REG). Microvilosidades (Mv). Complexo de Golgi (G).



## **Figura 16**

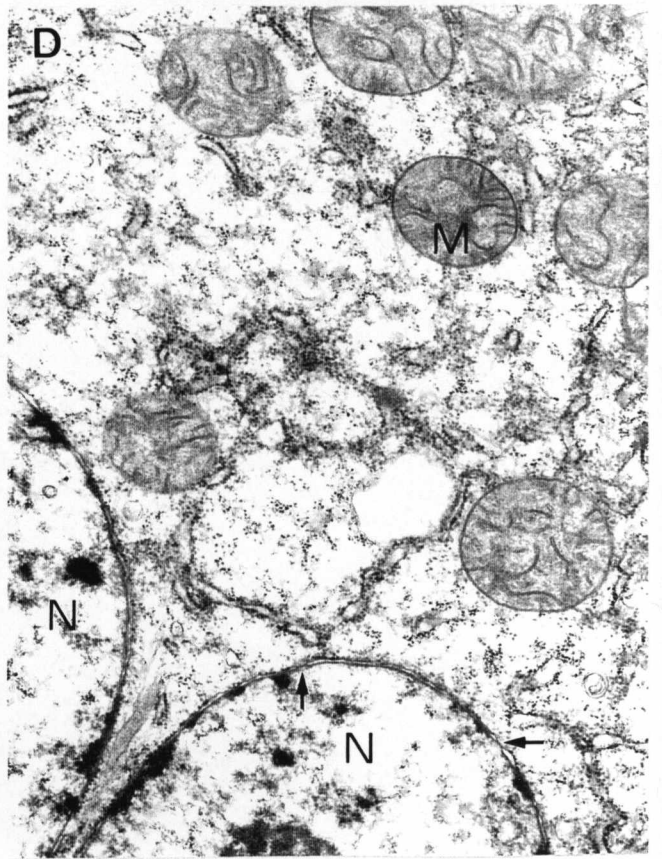
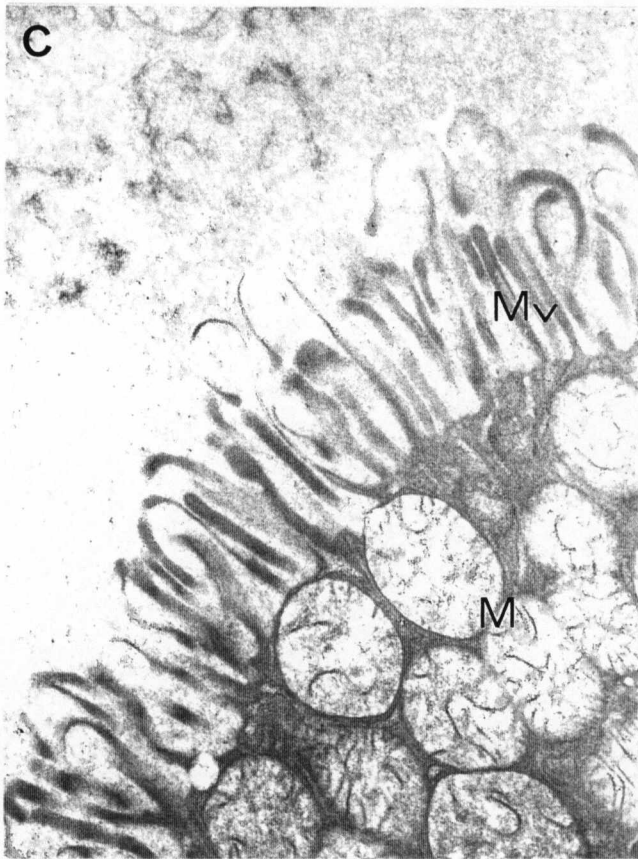
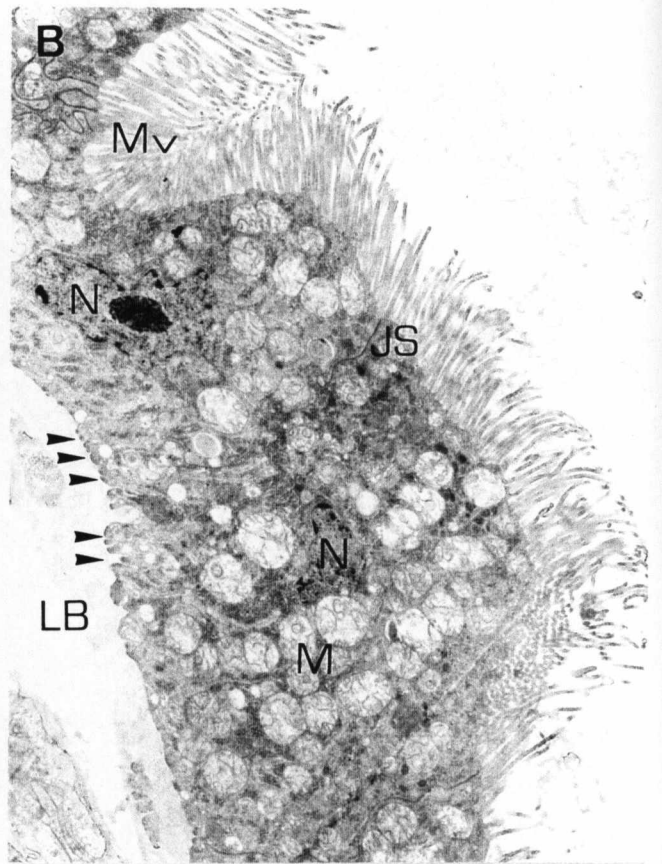
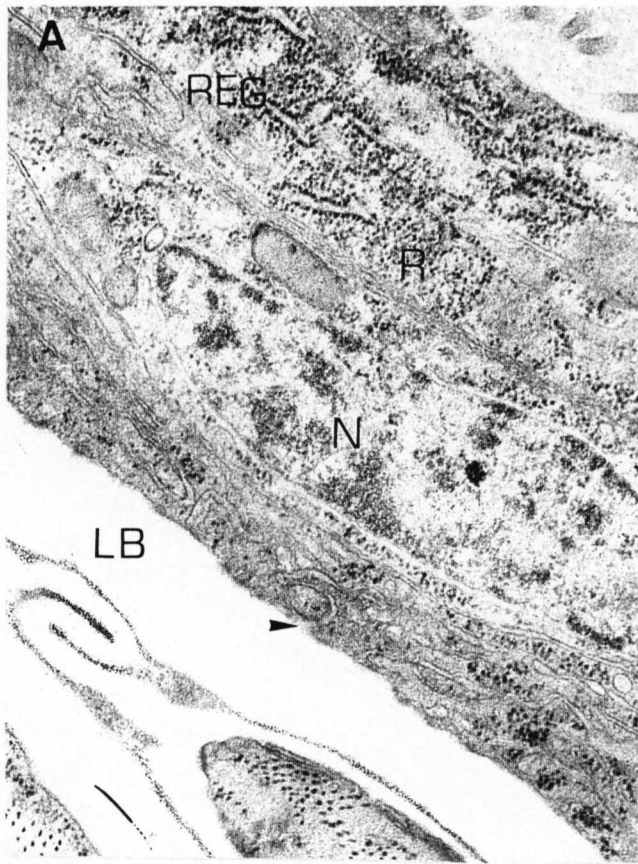
**A** - IMC. Mitocôndria em detalhe. X95500.

**B** - Célula do IMC onde se destacam as invaginações da membrana citoplasmática basal. Notar também, a presença de mitocôndrias, REG. X29000.

**C** - Enterócito do IMC. Notar grânulo de secreção na base de microvilosidade. X66000.

**D** - Enterócito do IMA. Nota-se grânulo de secreção na base de microvilosidade. X98000.

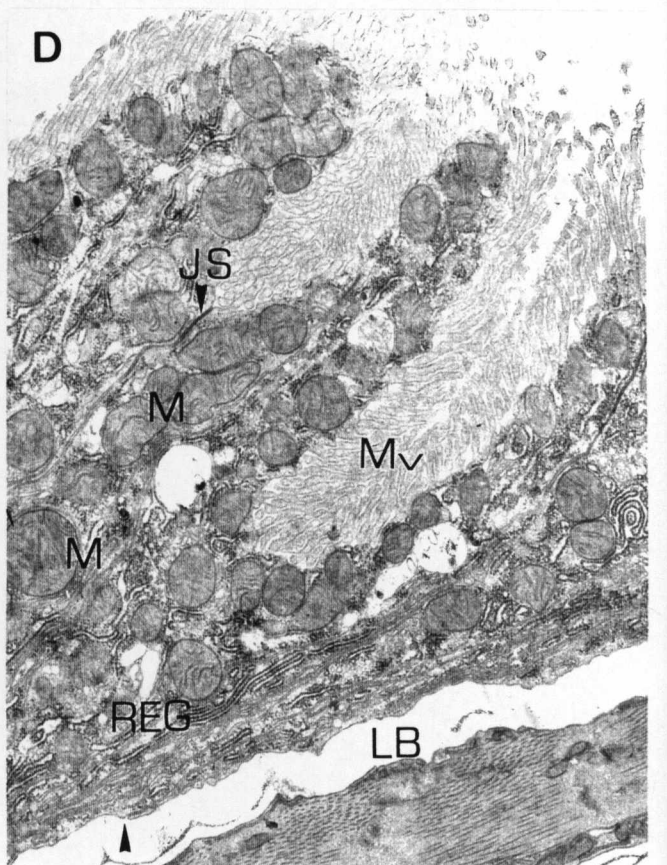
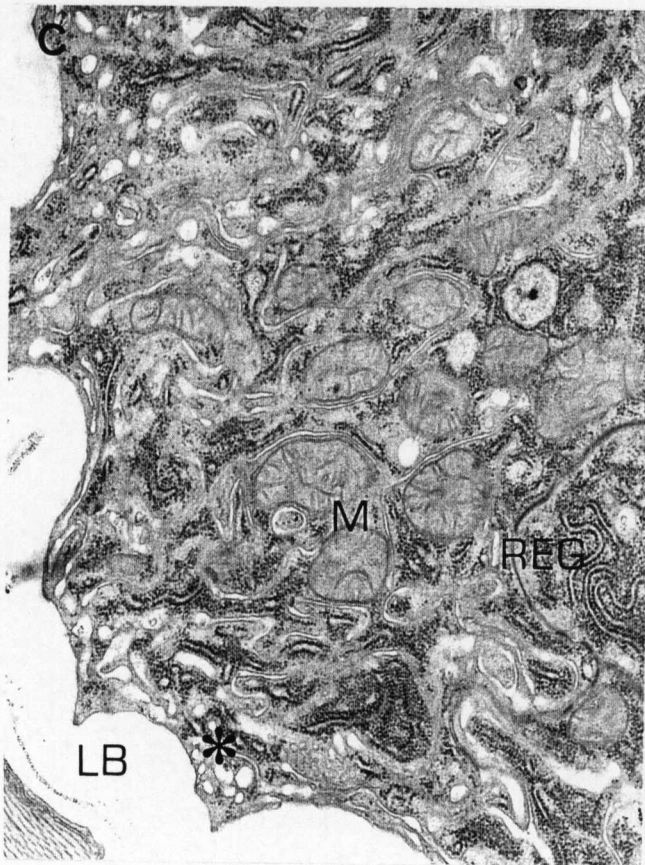
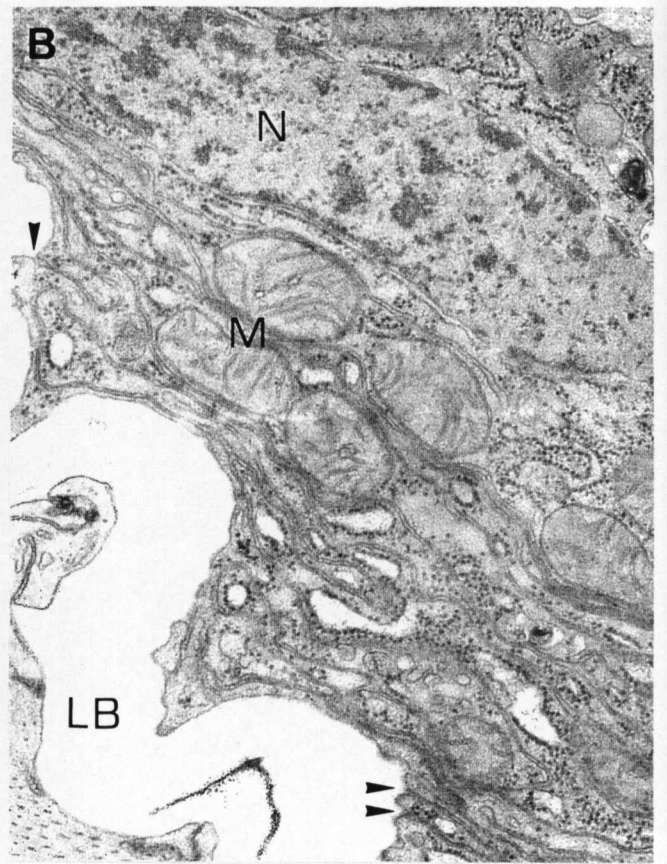
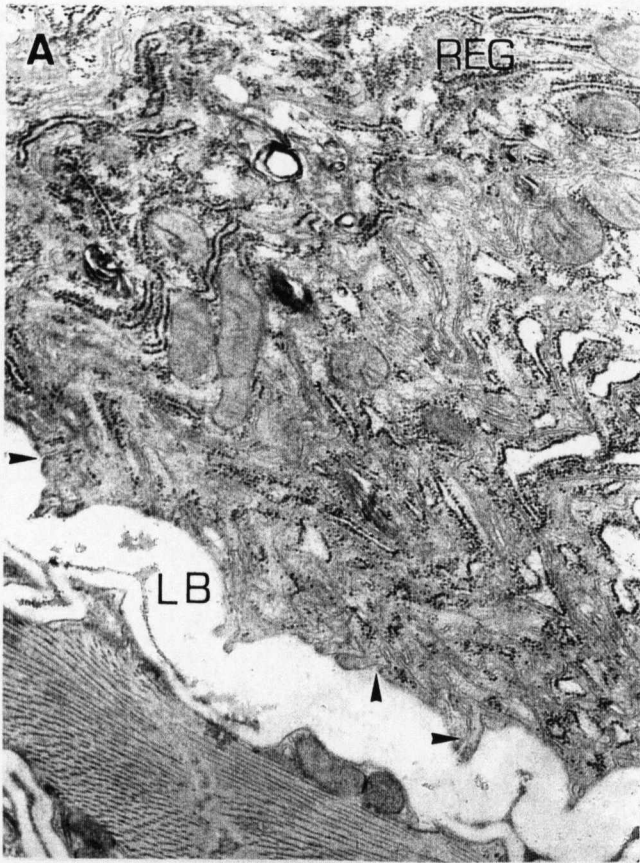
Grânulo de secreção (Gr). Mitocôndria (M). Microvilosidade (Mv). Invaginações da membrana basal (cabeças de seta). Retículo endoplasmático granular (REG). Lâmina basal (LB).



## Figura 15

- A** - IMA. A membrana plasmática basal emite discretas invaginações para o interior da célula. Notamos também o núcleo alongado e o REG expressivo. X28000.
- B** - Célula do IMP onde se destaca o grande número de mitocôndrias. As microvilosidades nessa região do tubo digestivo normalmente são mais longas que nas outras e sem grânulos de secreção. Notar as invaginações da membrana plasmática basal. X5500.
- C** - IMC. Observar a grande concentração de mitocôndrias. X22500.
- D** - Célula do IMA. Detalhes das mitocôndrias e do núcleo, no qual podemos observar os poros nucleares. X22000.

Invaginações da membrana plasmática basal (cabeças de seta). Junção septada lisa (JS). Microvilosidades (Mv). Núcleo (N). Poro nuclear (seta). Mitocôndrias (M). Retículo endoplasmático granular (REG). Lâmina basal (LB).

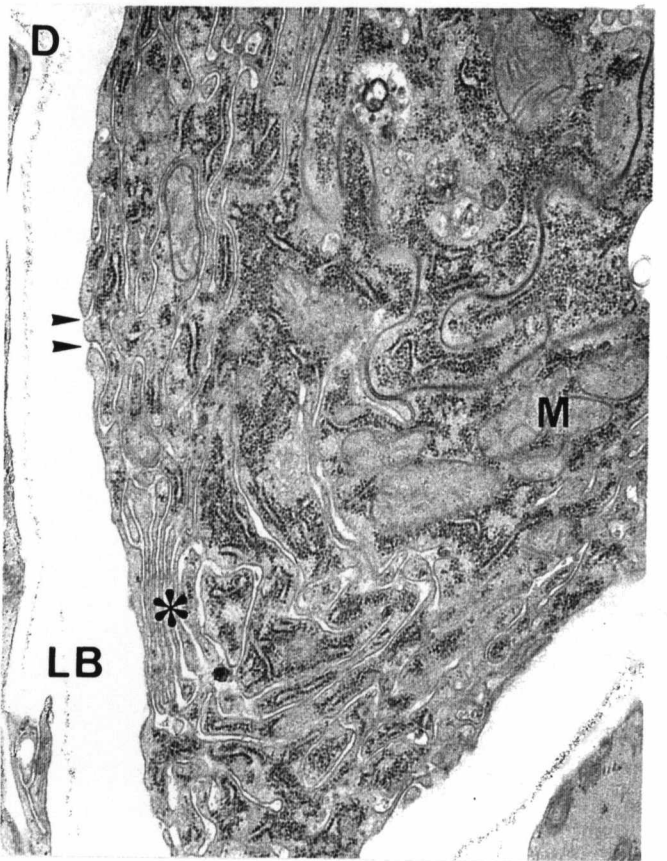
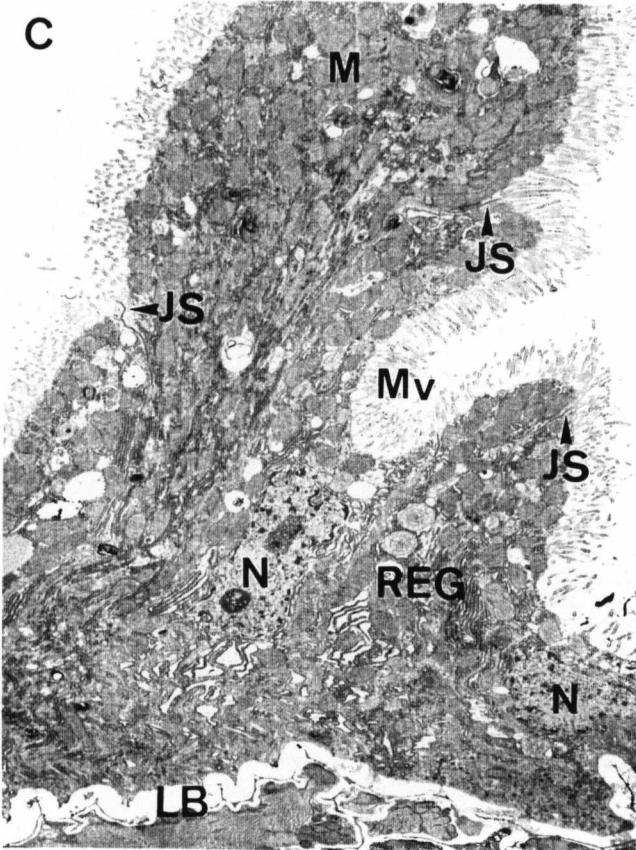
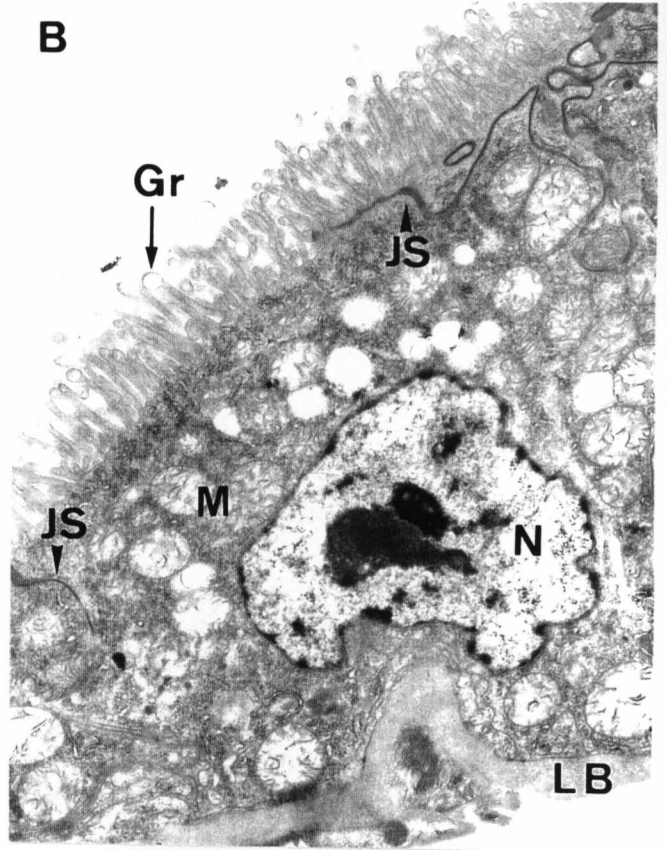
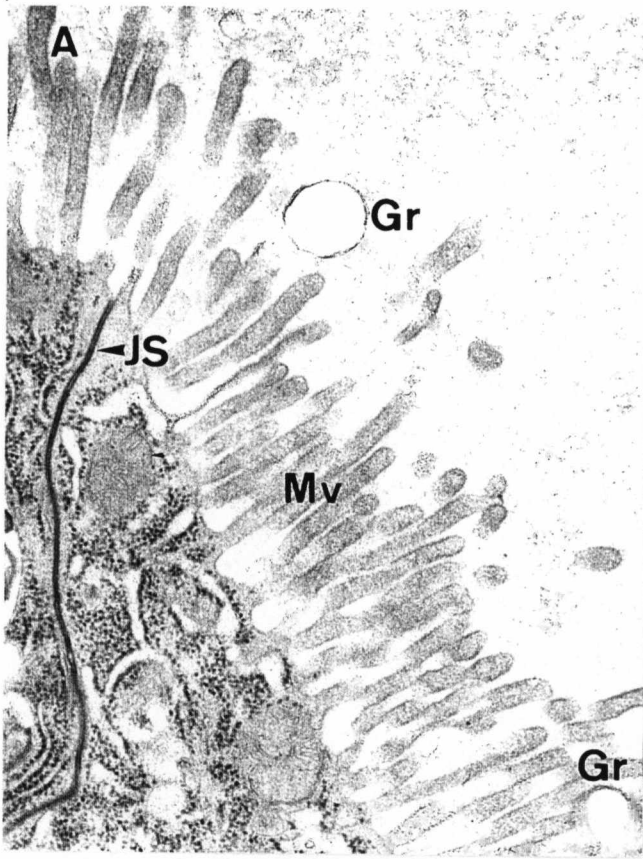


## Figura 14

- A** - Enterócito do IMC, que apresenta em sua membrana plasmática basal, invaginações que formam pequenos canalículos. As cisternas do REG estão amplamente distribuídas pelo citoplasma. X22500.
- B** - Enterócito do IMA. Notar núcleo, mitocôndrias e invaginações da membrana citoplasmática basal. X38000.
- C** - IMP. Região celular com aspecto vacuolizado. X22500.
- D** - Enterócitos do IMC. Nota-se grande quantidade de mitocôndrias. Perfis do REG estão distribuídos por todo o citoplasma. Discretas invaginações da membrana citoplasmática basal. X15500.

Invaginações da membrana plasmática basal (cabeças de seta). Retículo endoplasmático granular (REG). Mitocôndrias (M). Núcleo (N). Citoplasma basal com aspecto vacuolizado (asterisco). Invaginações da membrana citoplasmática basal Lâmina basal (LB).

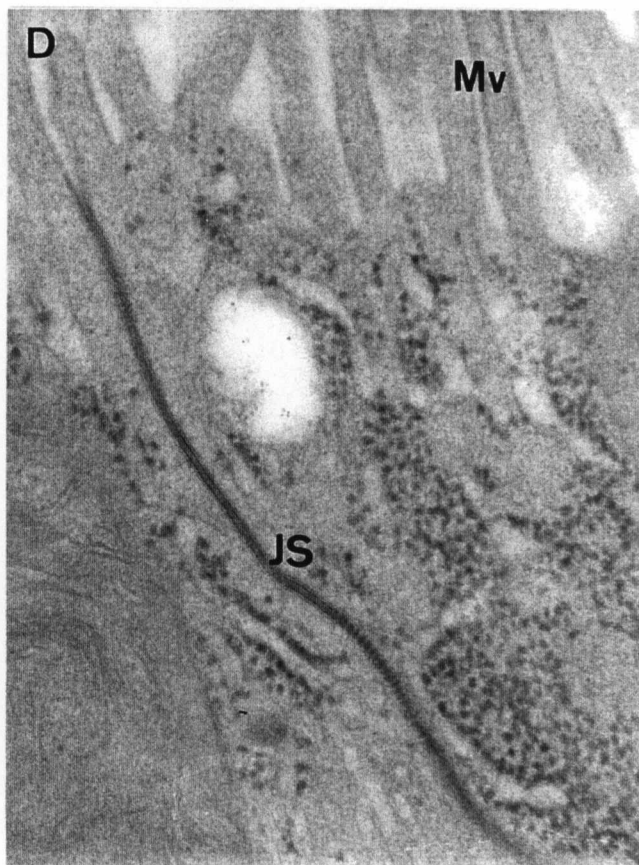
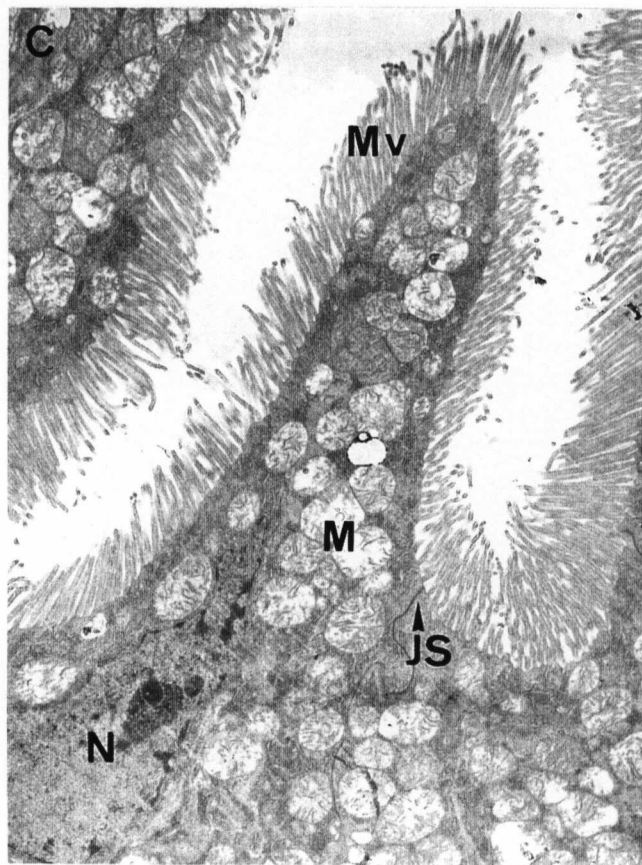
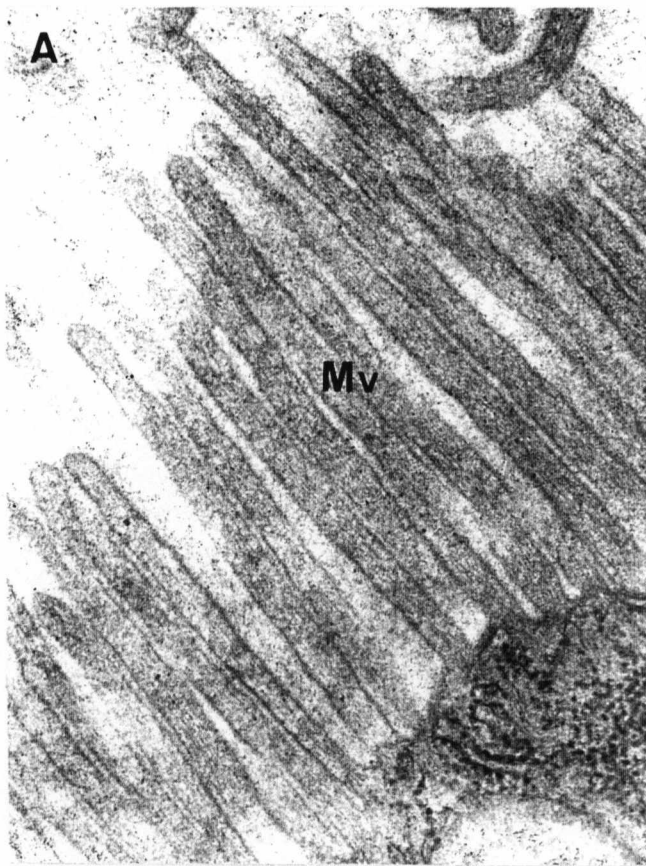




## Figura 13

- A** - Limite entre dois enterócitos do IMC. Notar junção septada lisa, microvilosidades e grânulos de secreção. X38000.
- B** - Enterócito do IMC onde se destacam as microvilosidades com grânulos de secreção, grande quantidade de mitocôndrias, o núcleo e, mantendo unidas as células vizinhas, junções septadas lisas. X8300.
- C** - IMA. Grupo de enterócitos que chamam a atenção pela diversidade morfológica. Observar: microvilosidades, núcleos, junções septadas lisas e retículo endoplasmático granular. X5500.
- D** - Enterócitos do IMP. A membrana plasmática basal apresenta invaginações que formam canais paralelos à membrana basal. Notar as aberturas da membrana plasmática basal. X23000.

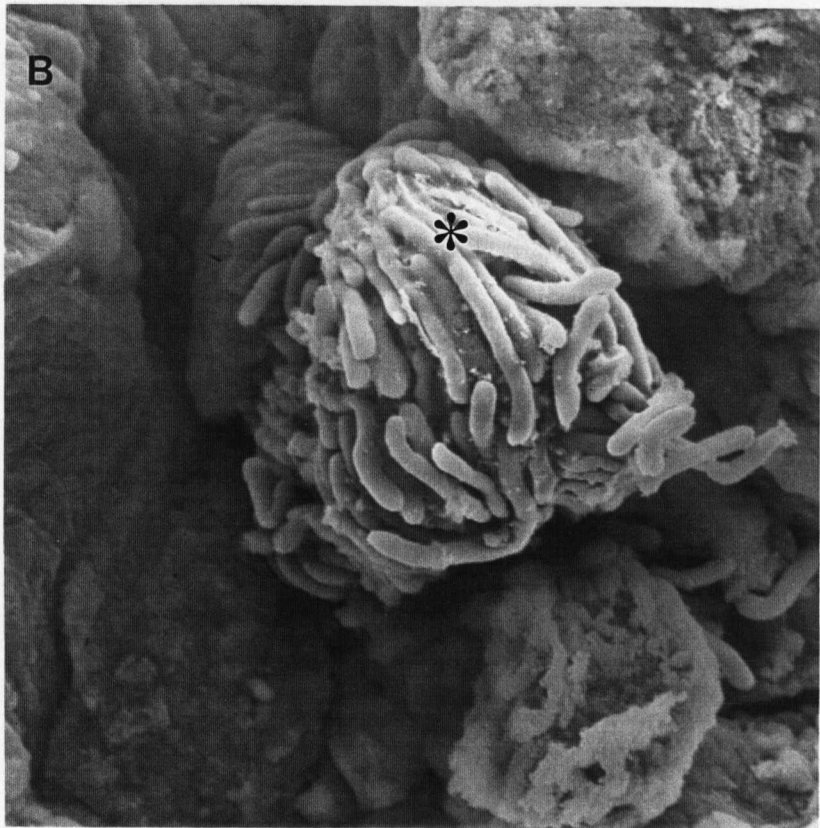
Grânulos de secreção (Gr). Junções septadas lisas (JS). Lâmina basal (LB). Microvilosidades (Mv). Mitocôndrias (M). Retículo endoplasmático granular (REG). Núcleo (N). Aberturas da membrana plasmática basal (cabeças de seta). Rede de canais, formada por invaginações da membrana plasmática basal (asterisco).



## Figura 12

- A** - IMP. Micrografia eletrônica de transmissão. Microvilosidades com aspecto retilíneo e sem ramificações. Notar feixes de microfilamentos no interior. X56000.
- B** - IMC. Vista em detalhe das microvilosidades. Observamos grânulo de secreção no ápice de uma microvilosidade e outro na base. Feixes de microfilamentos podem ser vistos no interior das microvilosidades. X90000.
- C** - Célula do IMC projetando-se em direção à luz. Chama a atenção a presença de junção septada lisa, o grande número de mitocôndrias, as abundantes microvilosidades e o núcleo, com pequenos grumos de cromatina condensada e o seu nucléolo. X6500.
- D** - Limites celulares no IMA, onde destaca-se uma junção septada lisa. X82000.

Grânulos de secreção (Gr). Junção septada lisa (JS). Microvilosidades (Mv).  
Mitocôndrias (M). Núcleo (N).

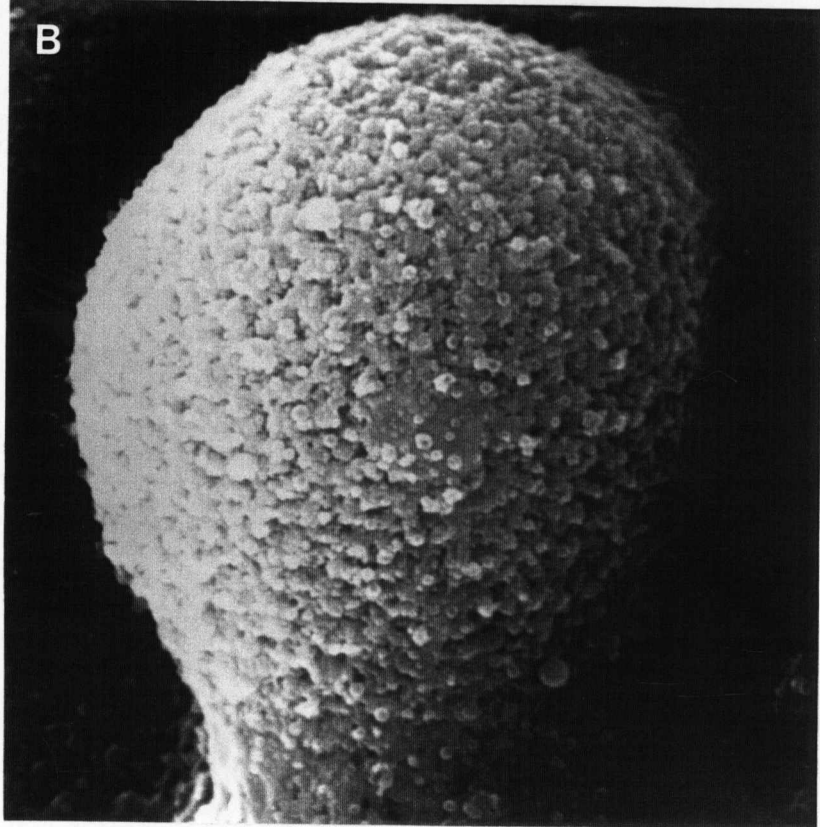
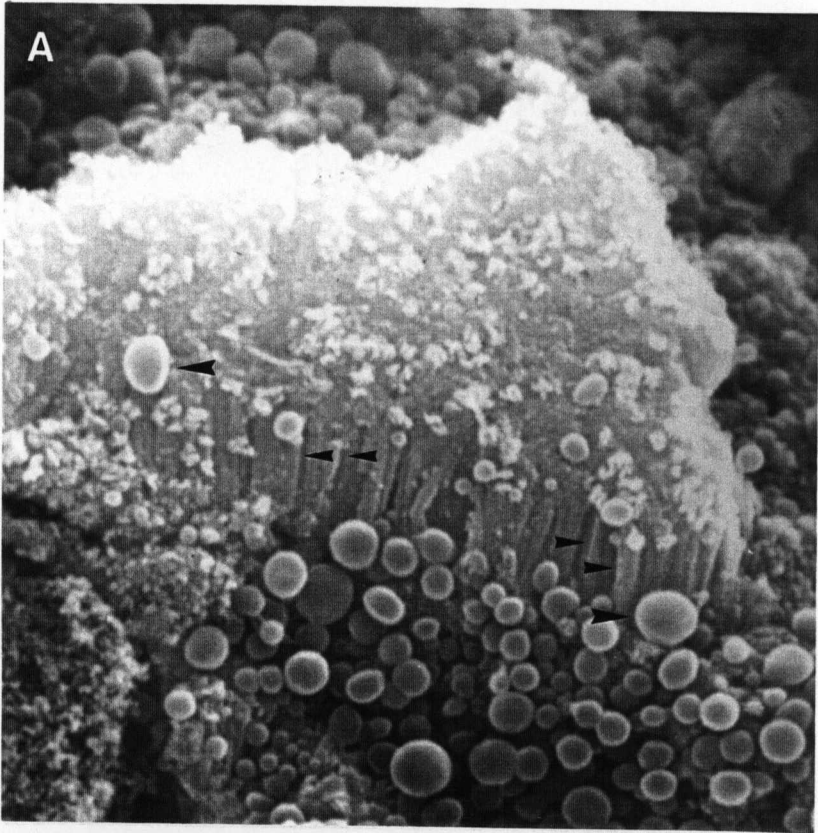


## **Figura 11**

**A** - Rompimento da membrana celular de um micetócito do IMC, com exposição das bactérias simbiotes. X3000.

**B** - Conjunto de simbiotes de um micetócito. X2000.

Bactérias simbiotes (asteriscos).



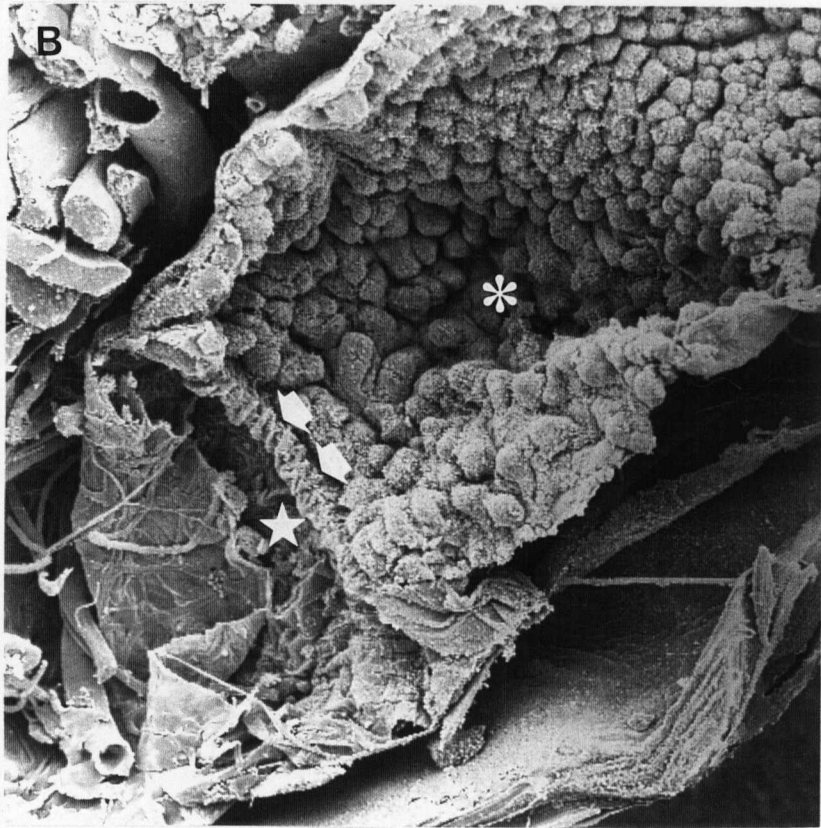
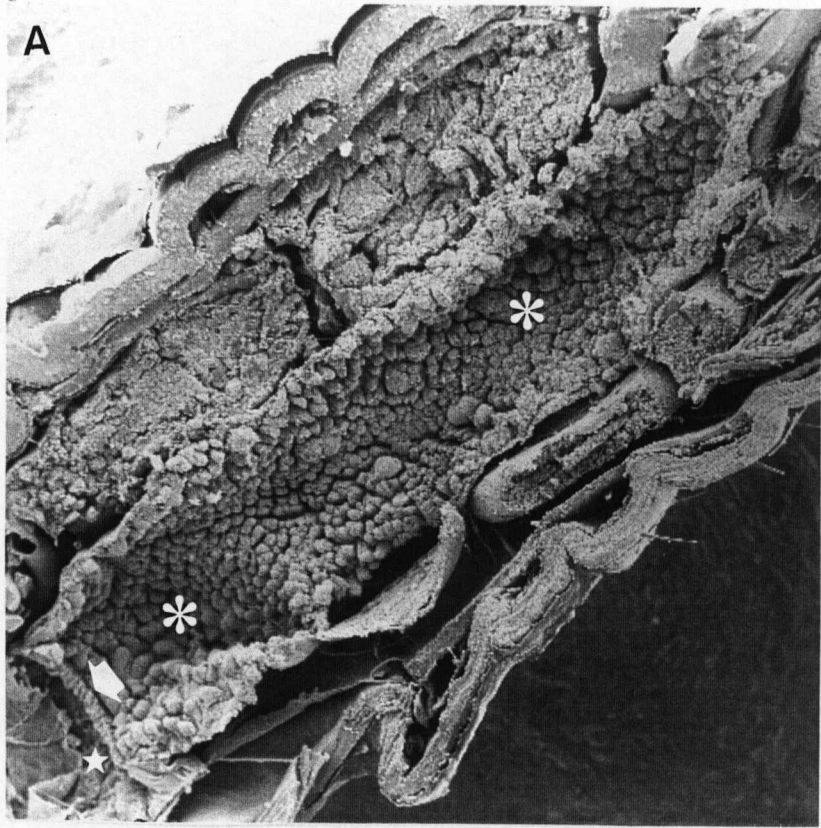
## **Figura 10**

**A** - Detalhe da superfície apical do epitélio do IMC, onde podemos observar vesículas de secreção na extremidade das microvilosidades. X15000.

**B** - Célula do IMC com as características morfológicas de um micetócito. X7000.

Vesículas de secreção (cabeças de seta maiores). Microvilosidades (cabeças de seta menores).



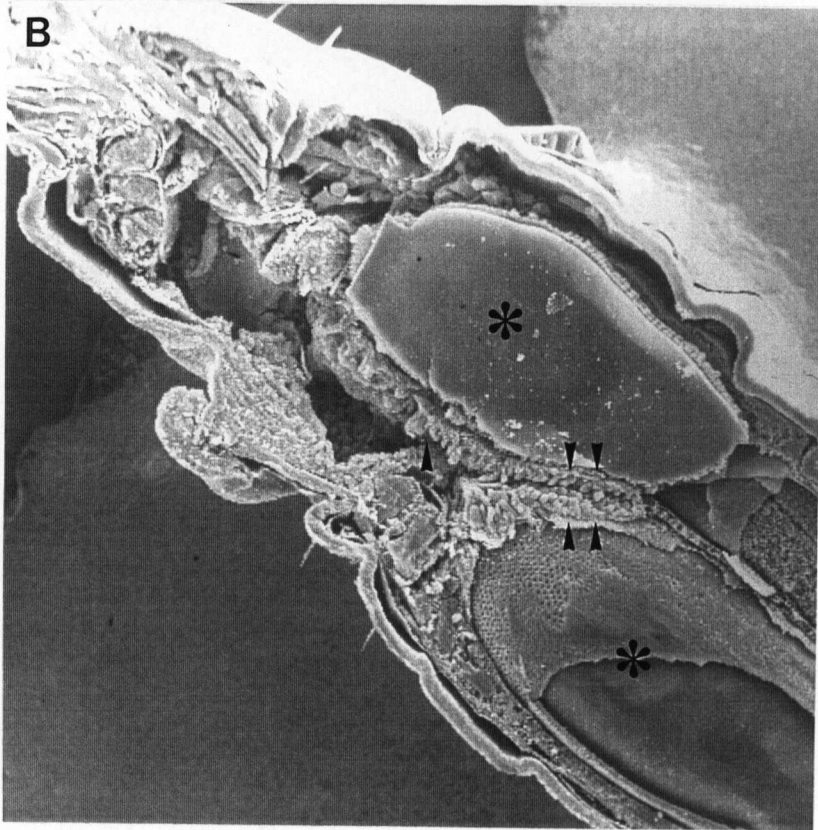
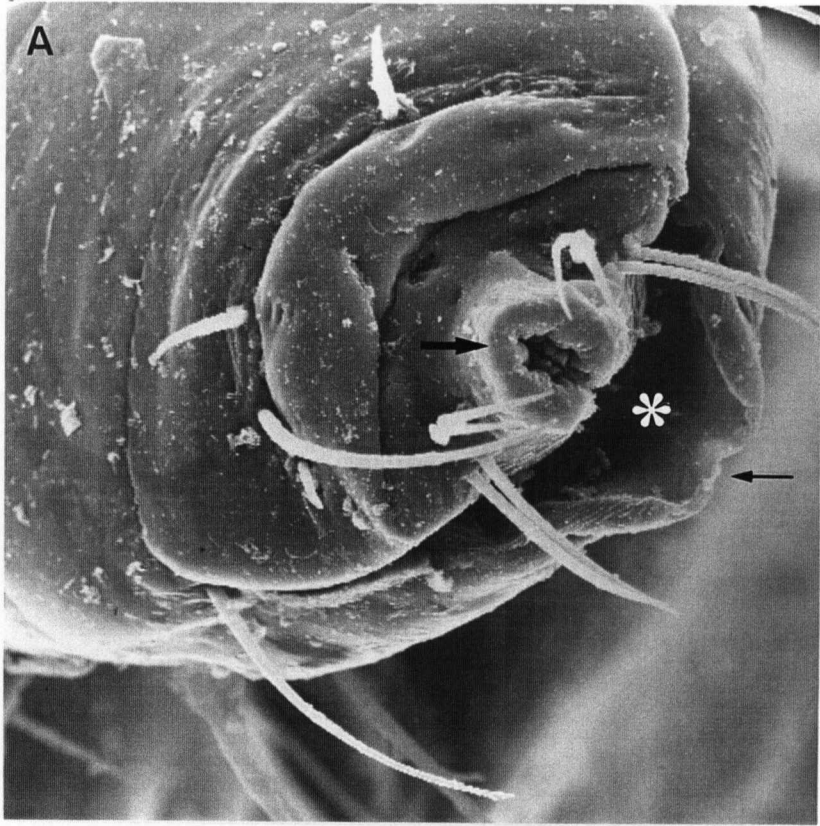


## Figura 9

**A** - Visão panorâmica do tubo digestivo de *H. suis* macho. X120.

**B** - Em maior aumento, imagem da transição do intestino anterior-IA para o intestino médio-IM. X300.

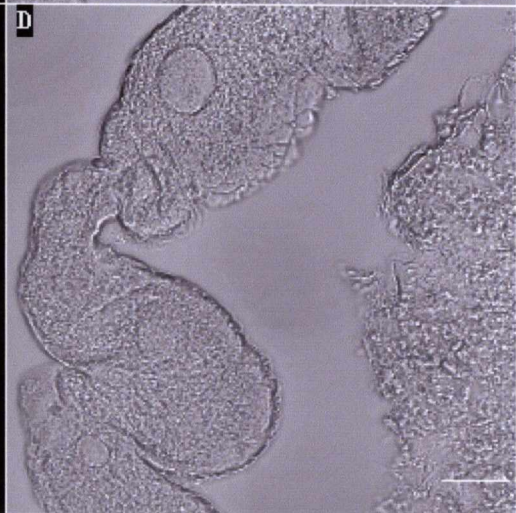
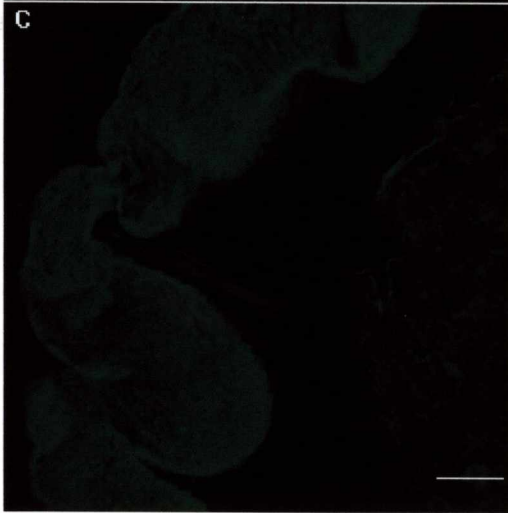
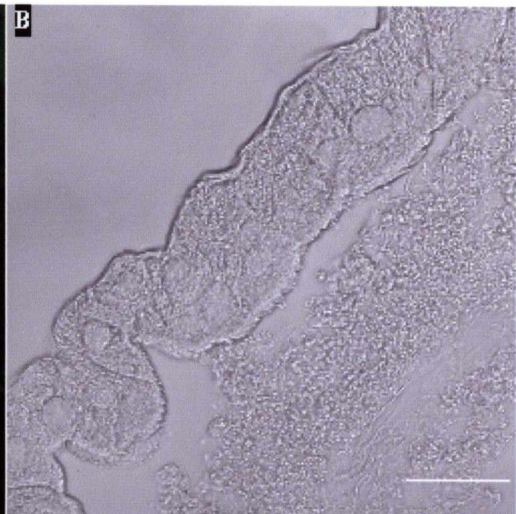
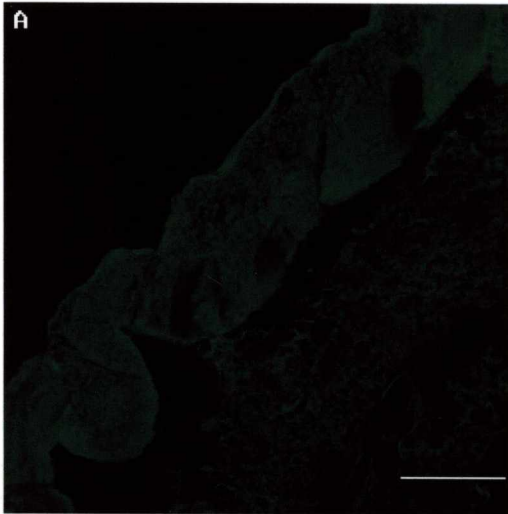
Intestino anterior-IA (estrela). Intestino médio-IM (asteriscos). Evaginação epitelial separando o IA do IM (setas).



## Figura 8

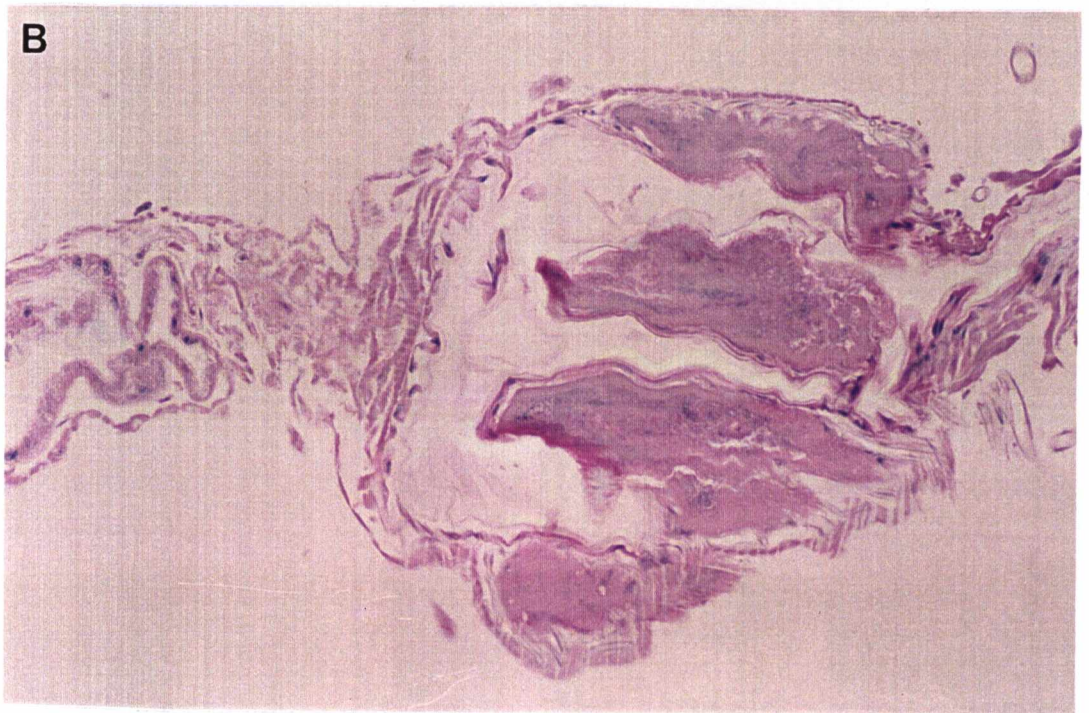
- A** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da extremidade anterior da cabeça de *H. suis*. Notar o lábio inferior e o superior, no qual temos a abertura por onde saem os estiletes perfurantes. X550.
- B** - Corte sagital de *H. suis* fêmea. A presença dos ovos (lêndeas) comprimem o tubo digestivo, alterando sua forma. X80.

Lábio inferior (seta menor). Lábio superior (seta maior). Abertura de saída dos estiletes perfurantes (asterisco branco). Ovos (lêndeas) (asteriscos pretos). Tubo digestivo (cabecinhas de seta).



## Figura 7

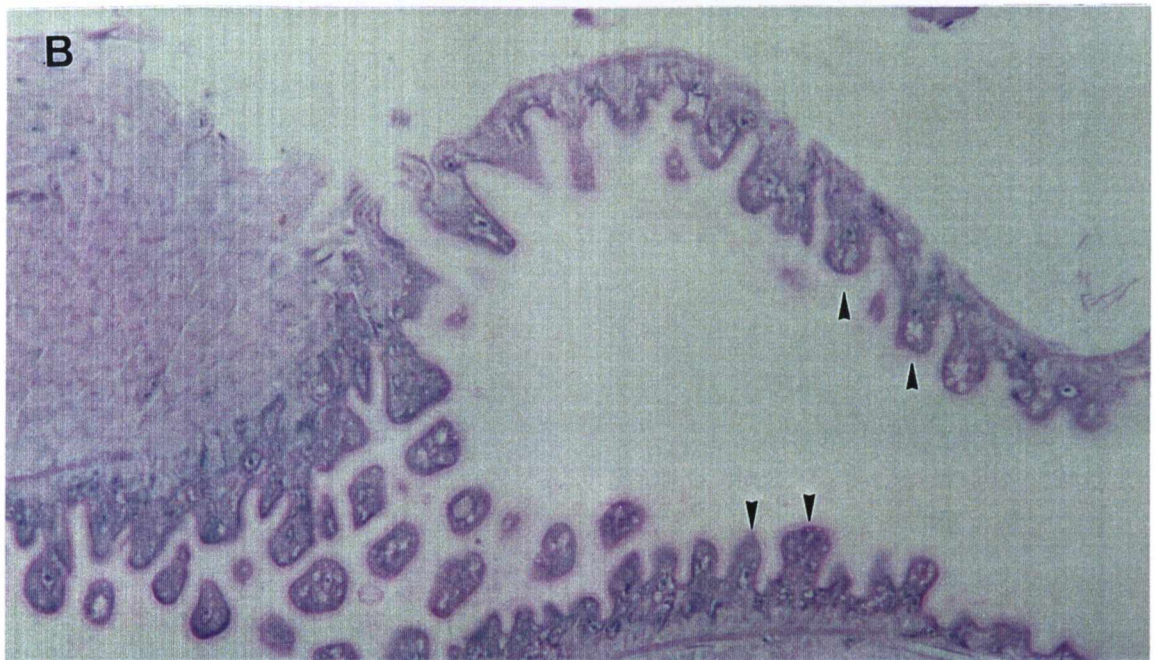
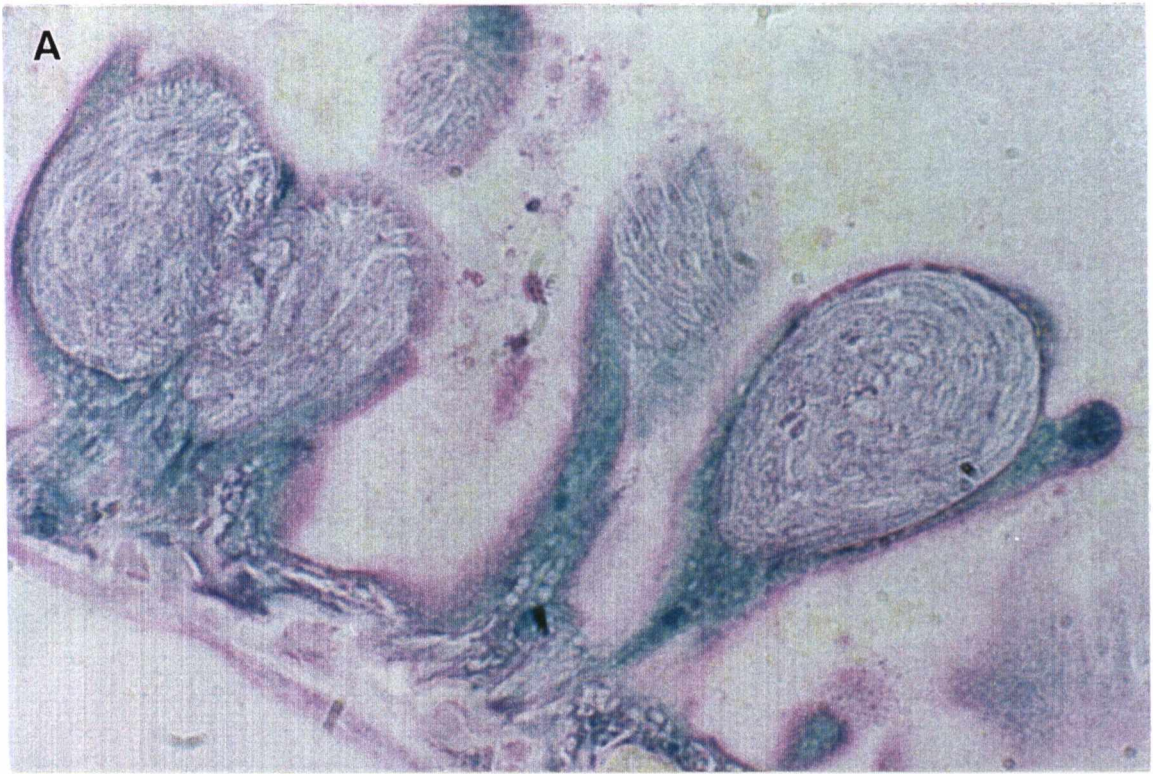
Imagens obtidas com microscopia confocal, de IMC de *H. suis* tratado pela técnica do WGA (**A, C**) e os mesmos campos, observados com microscopia de interferência de Nomarski (**B, D**) Observa-se as células epiteliais com seus respectivos núcleos. O conteúdo alimentar, na luz do tubo digestivo, mostra fraca reação ao WGA.  
Barras: **A** - 50 $\mu$ m. **B** - 50 $\mu$ m. **C** - 25 $\mu$ m. **D** - 25 $\mu$ m.



## **Figura 6**

- A** - Intestino posterior. Notar o epitélio cúbico simples revestido por cutícula (setas). X570.
- B** - Fotomicrografia do IP, região da papila retal. X320.

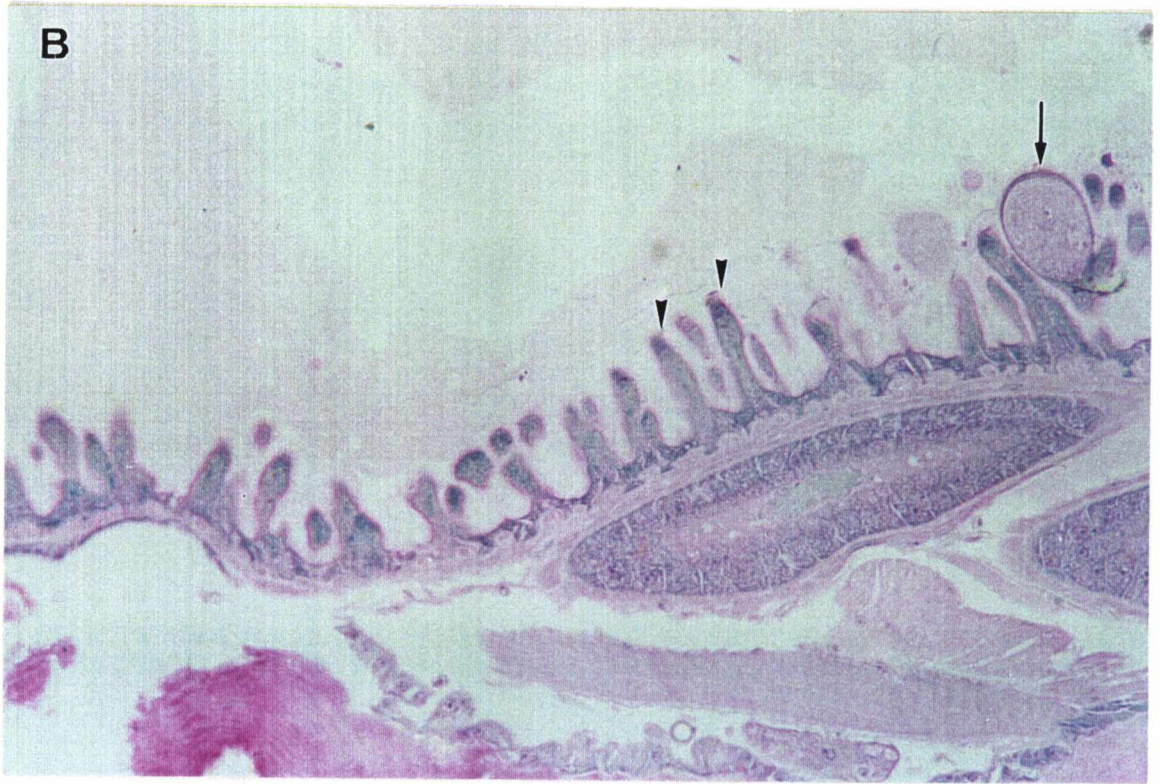
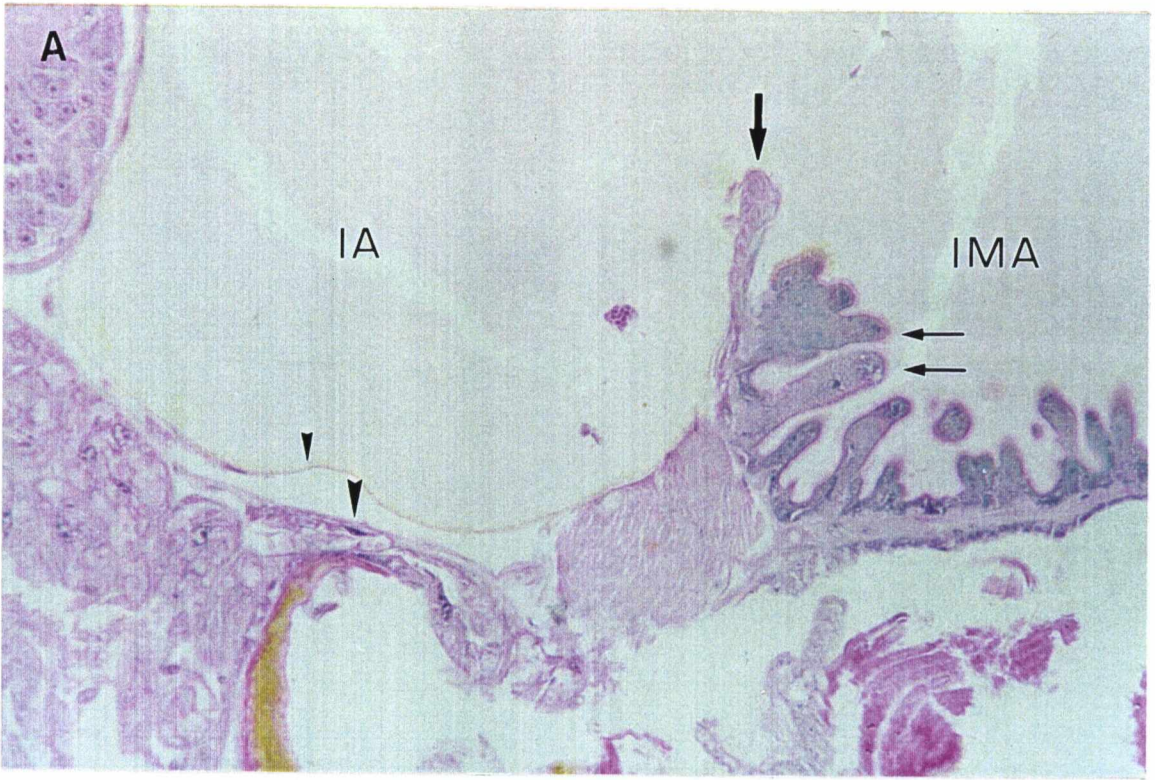




## **Figura 5**

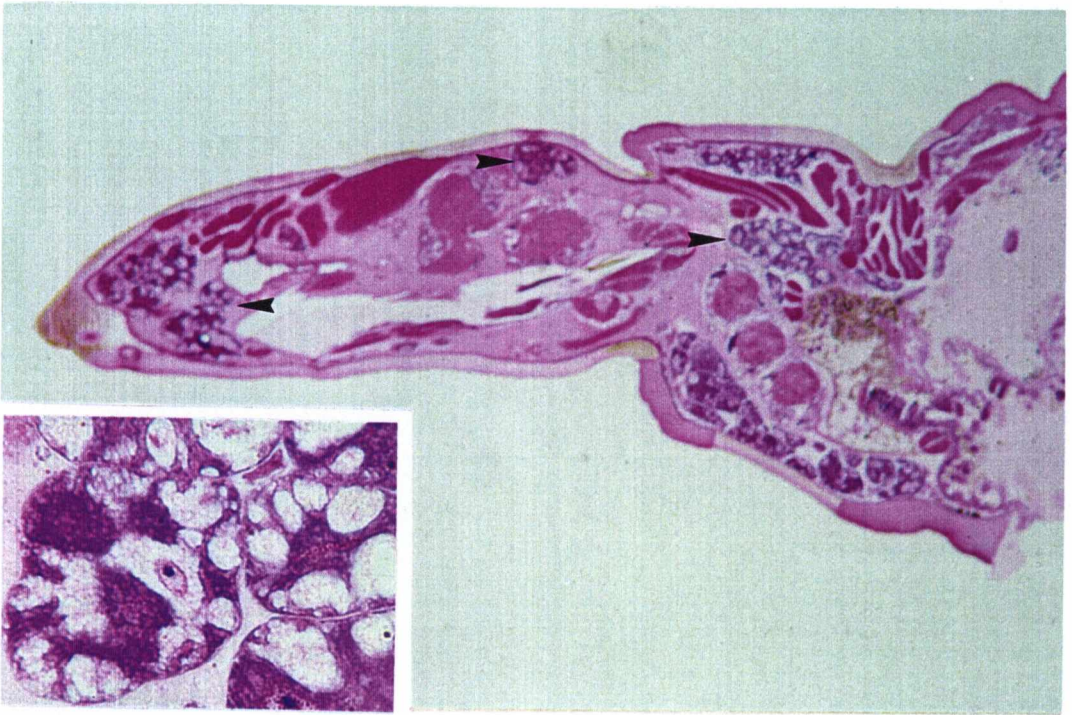
**A** - IMC. Micetócitos. X1400.

**B** - IMP. Epitélio constituído por células colunares baixas (setas). X400.



## **Figura 4**

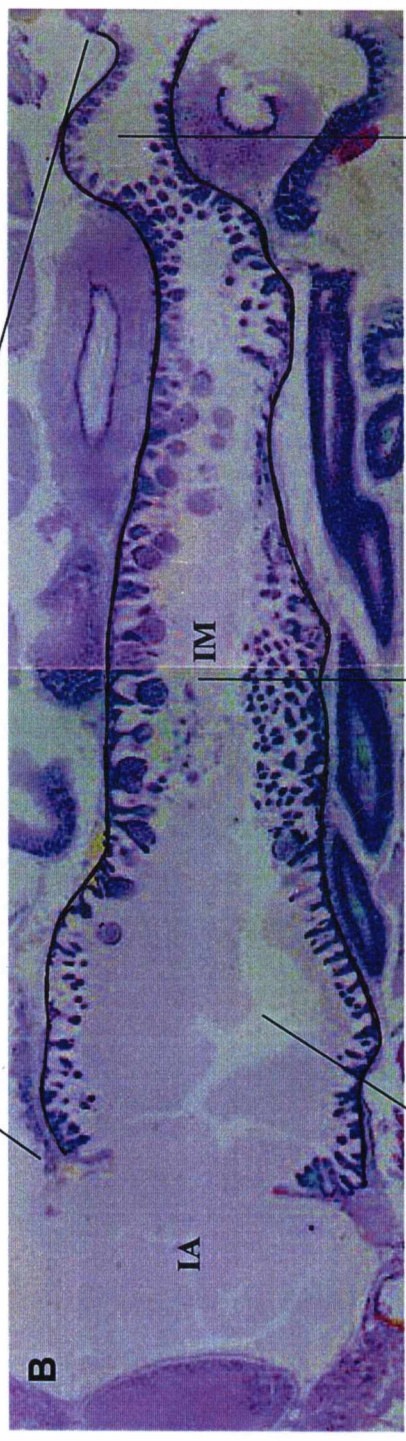
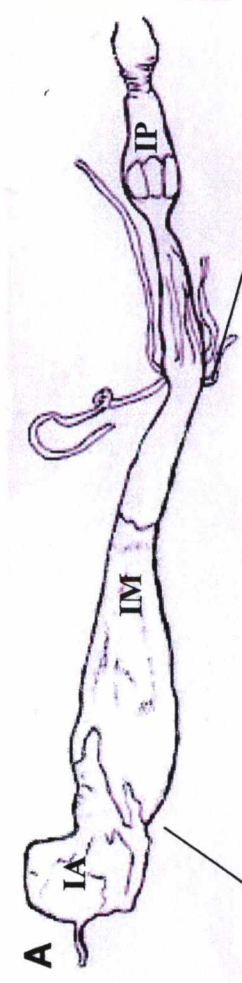
- A** - Fotomicrografia onde observamos o intestino anterior (IA), revestido por epitélio pavimentoso simples (cabeça de seta maior), recoberto por cutícula (cabeça de seta menor) e o intestino médio anterior (IMA). Notar o limite entre as duas regiões do intestino (seta maior). Enterócitos (setas menores). X400.
- B** - Intestino médio anterior. Enterócitos (cabeças de seta). Micetócito (seta). X400.



### **Figura 3**

Fotomicrografia da cabeça e início do tórax. Glândula salivar (cabeças de seta). X70.

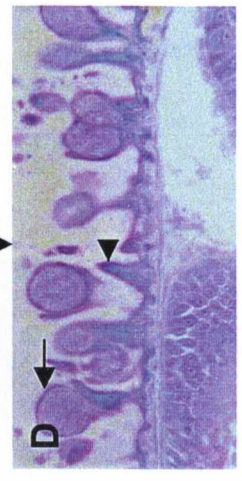
Detalhe - células da glândula salivar em maior aumento. X550.



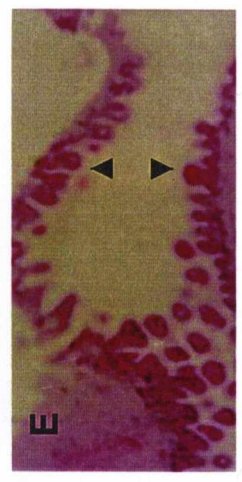
IMA



IMC



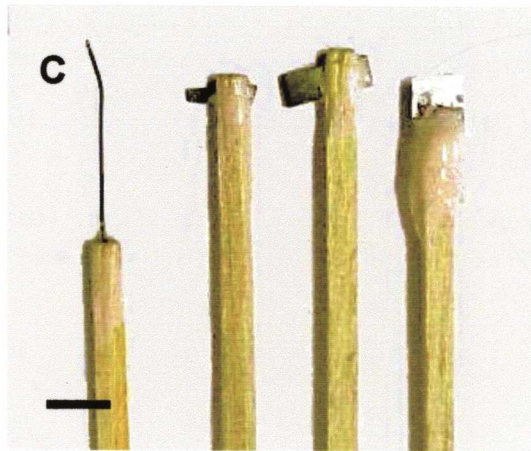
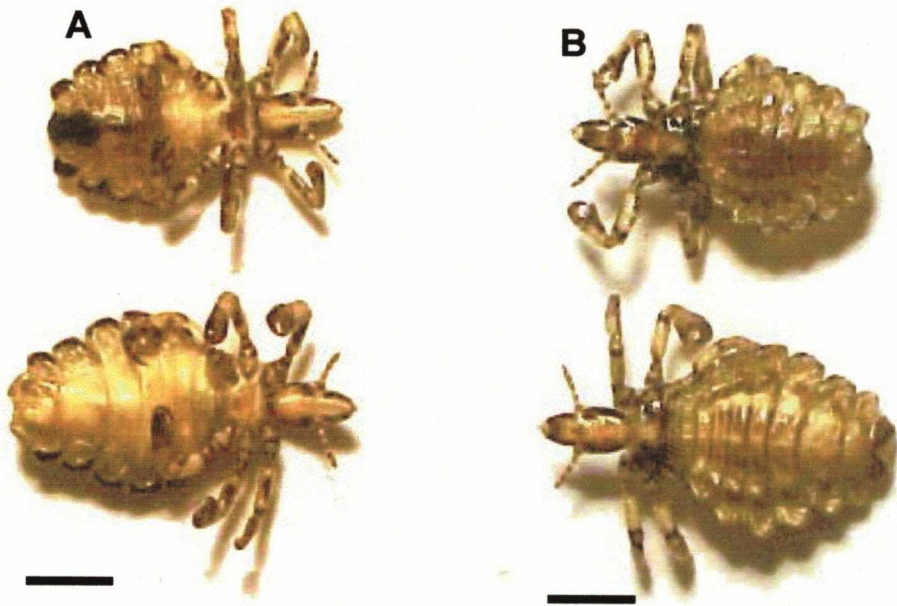
IMP



## Figura 2

- A** - Desenho esquemático do tubo digestivo do *H. suis*. O tubo digestivo foi representado distendido. ~X30
- B** - Fotomicrografia onde podemos observar parte do intestino anterior (IA) e o intestino médio (IM). Notar a invaginação do epitélio, onde temos a transição do IA para o IM (seta). X85.
- C** - Fotomicrografia do intestino médio anterior (IMA). Observamos a predominância de enterócitos com morfologia colunar. Notar a presença de micetócito no IMA. X360.
- D** - Intestino médio central (IMC). Notar a presença de micetócitos (seta) e enterócitos (cabeça de seta). X200.
- E** - Intestino médio posterior (IMP). O epitélio desta região é constituído predominantemente por células colunares baixas (cabeças de seta). Notar a ausência de micetócitos. X180.





## Figura 1

- A** - *Haematopinus suis* visão ventral. O macho apresenta uma placa escura, na região terminal do abdômen. Barra = 1 mm.
- B** - *Haematopinus suis* visão dorsal. Observamos que o macho (acima) possui o abdômen mais arredondado que a fêmea. Barra = 1 mm.
- C** - Instrumentos construídos e utilizados para a dissecação dos animais.  
Barra = 5 mm.