

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais - ICBN
Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia - CPMTI

Maria Tays Mendes

Avaliação do efeito da saliva de triatomíneos (Heteroptera: Reduviidae) sobre a biologia de
células dendríticas murinas

Uberaba

2014

Maria Tays Mendes

Avaliação do efeito da saliva de triatomíneos (Heteroptera: Reduviidae) sobre a biologia de células dendríticas murinas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, área de concentração “Imunologia e Parasitologia aplicada”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira

Uberaba

2014

Maria Tays Mendes

Avaliação do efeito da saliva de triatomíneos (Heteroptera: Reduviidae) sobre a biologia de células dendríticas murinas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, área de concentração “Imunologia e Parasitologia aplicada”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

07 de Julho de 2014.

Banca Examinadora:

Uberaba

2014

Dedico este trabalho aos meus pais, Terezinha e João Pedro, ao meu marido, Leandro, ao meu amado filho, Luís Felipe e aos meus sogros, Susana e Edson. Obrigada pelo apoio, amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira pelo grande exemplo de pesquisador e professor, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo, pela confiança depositada em mim e por ter me auxiliado não somente no meu crescimento científico, mas também pessoal. Gratidão eterna...

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Ramirez, primeiramente pelo convite feito a mim para fazer parte de seu grupo ainda na graduação, além disso, pelos ensinamentos, por ter me auxiliado nos primeiros contatos com os triatomíneos e por nos ceder o uso do insetário sem restrições.

A Prof.^a Dr. Ana Carolina B. M. Anê principalmente pela amizade, pelos momentos compartilhados, por ter nos ensinado tudo o que sabia sobre os triatomíneos e por ter nos auxiliado com as coletas.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior pelo exemplo de pesquisador e por ceder as dependências e equipamentos do laboratório de imunologia para realização de todos os experimentos.

Ao Prof. Dr. Javier Emílio Lazo Chica pelos animais cedidos que possibilitaram a realização dos experimentos.

A todos os docentes da Pós-graduação em Medicina Tropical por todos os ensinamentos e experiências transmitidos, fundamentais para a minha formação de mestre.

Aos funcionários do laboratório de imunologia e de parasitologia, Mônica, Betânia, Cida, Atila, Luciano e Cidinha pelo auxílio técnico prestado.

Ao laboratório do Multiusuário pelo uso dos equipamentos, em especial à Keila pela ajuda com as fotos do gel.

A secretária da Pós-graduação, Joyce por estar sempre disposta a nós ajudar e por ser sempre paciente com os nossos pedidos de última hora.

Aos colegas de biotério, Beatriz, Ana Luiza, Tamires e Kamila por tornarem o trabalho mais descontraído e fazerem as horas passarem mais rápido.

A todos os colegas do laboratório de imunologia pela alegre convivência, pelos momentos de descontração, e pelas discussões científicas e trocas de experiências. Um agradecimento especial àqueles que me auxiliaram na correção desta dissertação.

Aos colegas e ex-colegas da pós-graduação em Medicina Tropical pela ótima convivência, pela ajuda durante as disciplinas e pela troca de experiências. Um agradecimento especial para aqueles que já me deram carona, valorizo a disponibilidade de vocês.

Ao Thiago, por ter me ensinado tudo sobre a dinâmica do laboratório, desde a localização dos materiais ao preparo dos reagentes e execução dos experimentos.

Aos colegas de insetário, Ana, Thati, Guilherme, Kamila e Edson pela ajuda mútua com a manutenção e limpeza das colônias de triatomíneos que nos tomou tanto tempo e dedicação.

Ao Leonardo pela ajuda com a obtenção do fenograma de proteínas.

Aos queridos e eternos amigos (BFF e Dir.), Marcos, Monique, Lara e Tamires pelos ótimos momentos vividos juntos, dentro e fora da UFTM, pela amizade e pelas risadas. Ao Marcos pelo auxílio com as citometrias, com a execução dos experimentos e análise dos resultados. À Monique pela ajuda com a eletroforese de proteínas. À Lara pelas correções, pelo empréstimo de materiais e por me inspirar a ser mais “decidida”. À Tamires pela amizade sincera, pelos conselhos dados, pelo companheirismo e pela ajuda na execução de todos os experimentos. Obrigada por me permitirem fazer parte deste grupo, vocês são especiais.

A todos os meus familiares pelo incentivo e compreensão. Em especial, aos meus pais, Terezinha e João Pedro, que apesar da distância não deixaram de me apoiar e de acreditarem em mim. Ao meu marido, Leandro, e ao meu filho, Luís Felipe pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Aos meus tios, Amantino, Joelma, Dagma, aos primos, Pollyana, Loiany, Lorrany, Yara, Arthur, Douglas, Diego e Dulio, aos meus sogros, Susana e Edson, e a minha cunhada Thamyres por tornarem essa jornada menos árdua e mais feliz.

A todos que direto ou indiretamente ajudaram na execução desse trabalho.

Aos órgãos de fomento, Fundação de Amparo à pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Rede Mineira de Pesquisa em Doenças Infecciosas (NIDR-MG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa e pela concessão da bolsa.

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

“Vai dar certo.”

Tamires Marielem (Best friend)

RESUMO

Mendes, M.T. **Avaliação do efeito da saliva de triatomíneos (Heteroptera: Reduviidae) sobre a biologia de células dendríticas murinas.** 99 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba/MG, 2014.

Triatomíneos são artrópodes hematófagos de grande interesse médico, por serem vetores do *Trypanosoma cruzi*. Durante a alimentação eles precisam vencer duas grandes barreiras impostas pelo sistema de defesa dos seus hospedeiros, o sistema hemostático e o sistema imune. Na tentativa de subverter as barreiras hemostáticas, é sabido que a saliva desses insetos, inoculada durante a hematofagia, contém inúmeras moléculas bioativas, no entanto, poucas moléculas com atividade sobre a barreira imune foram caracterizadas. Células dendríticas (CDs), presentes na pele de todos os vertebrados, são células fundamentais da resposta imune inata e desempenham papel crucial na indução da resposta imune adquirida, inclusive contra artrópodes hematófagos, é de grande interesse compreender se os triatomíneos evadem das respostas por modular essas células. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da saliva dos triatomíneos *Panstrongylus herreri*, *Meccus pallidipennis*, *Triatoma lecticularia* e *Rhodnius prolixus* sobre a diferenciação, maturação (expressão de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras e produção de citocinas) e apoptose de CDs. Além disso, tentamos identificar se a saliva das espécies de triatomíneos possuíam prostaglandina E₂ (PGE₂) em sua constituição. A saliva dos triatomíneos adultos foi obtida através da dissecação das glândulas salivares e as CDs foram obtidas a partir da diferenciação de células precursoras da medula óssea na presença de GM-CSF (25 ng/mL). A influência da saliva na diferenciação em CDs (expressão de marcadores moleculares CD11c, CD11b, MHC-II, CD40 e CD86 por citometria de fluxo) foi analisada através da incubação de células tronco de camundongos C57BL/6 durante 7 dias na presença da saliva das diferentes espécies. Para avaliação da maturação, CDs já diferenciadas foram estimuladas com LPS na presença ou não de saliva e avaliadas por citometria, para a expressão das moléculas MHC-II, CD40, CD80 e CD86 ou pelo método de ELISA, para a produção de citocinas TNF- α , IL-12p40, IL-10 e IL-6. A diferenciação das CDs foi inibida pela saliva das espécies de triatomíneos testadas e essa atividade inibitória (diluição 1:30 v/v) foi de 79% para a espécie *P. herreri*, 57% para *M. pallidipennis*, 38% para *T. lecticularia* e 76% para *R. prolixus*. A expressão das moléculas MHC-II, CD40 e CD86 nas CDs diferenciadas na presença de saliva foi modulada diferencialmente nas diferentes espécies. Em relação à maturação, a saliva inibiu diferencialmente a expressão de MHC-II, CD40, CD80 e CD86 nas CDs estimuladas com LPS - ligante de Toll-Like receptor 4, sendo que a molécula CD40 foi a única inibida pelas quatro espécies. Com exceção da saliva do *R. prolixus* que induziu IL-6, a produção das citocinas TNF- α , IL-12 e IL6 foi inibida e a produção da IL-10 foi aumentada pela saliva das espécies testadas. Vale ressaltar que a saliva, per se, dependendo da espécie, induziu a produção das citocinas IL-12, IL-6 e IL-10 em CDs. A única saliva que induziu apoptose nas CDs, foi a da espécie *R. prolixus*. A presença de prostaglandina-E₂ (PGE₂) na saliva dos triatomíneos não foi detectada. Esses resultados demonstram que a saliva dos triatomíneos possui moléculas capazes de modular a biologia de CDs e este efeito é independente da presença de PGE₂. A diminuição na diferenciação, a modulação de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras, a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e a indução de IL-10, além de gerar um ambiente muito menos agressivo para a alimentação pode também favorecer a transmissão de patógenos, incluindo o *T. cruzi*.

Palavras-chave: Triatomíneos. Saliva. Células dendríticas. Imunomodulação.

ABSTRACT

Mendes, M.T. **Evaluation of the effect of triatomine saliva (Heteroptera: Reduviidae) on the biology of murine dendritic cells.** 99 f. Dissertation (Master degree) – Postgraduate Course of Tropical Medicine and Infectology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba/MG, 2014.

Triatomines are blood-sucking arthropods of great medical interest because they are vectors of *Trypanosoma cruzi*, the ethiological agent of Chagas disease. During feeding triatomines need to overcome two major barriers imposed by the host defense systems: hemostasis and the immune system. While it is known that several molecules are capable of subverting the host hemostatic barriers, only few molecules capable of subverting the immune system have been characterized by these ectoparasites. Dendritic cells (DCs), present in the skin of all vertebrates, are key components of the innate immune response playing a crucial role in the induction of acquired immunity to many aggressive agents, including bloodsucking arthropods, and are of great interest to understand whether triatomines evade the responses by modulating these cells. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of the saliva from triatomines *Panstrongylus herreri*, *Meccus pallidipennis*, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma lecticularia* on differentiation, maturation (expression of stimulatory and co-stimulatory molecules and cytokine production) and apoptosis of DCs. In this work we also try to identify if the saliva of these species have prostaglandin E2 (PGE₂) in its constitution. Saliva from adult triatomines were obtained by dissection of salivary glands and the DCs were obtained from the differentiation of mouse bone marrow precursor cells in the presence of GM-CSF (25 ng/mL). The influence of saliva on DCs differentiation was analyzed by incubation of stem cells from C57BL/6 mice for 7 days in the presence of saliva and after this time the expression of molecular markers CD11c, CD11b, MHC-II, CD40, and CD86 were evaluated by flow cytometry. To assess the cell maturation, differentiated DCs were stimulated with LPS in the presence or absence of saliva and the expression of MHC-II, CD40, CD80 and CD86 was evaluated by flow cytometry and the production of cytokines TNF- α , IL-12p40, IL-10 and IL-6 was evaluated by ELISA. The differentiation of DCs was inhibited by the four tested saliva and this inhibitory activity (dilution 1:30 v / v) reached 79% for the specie *P. herreri*, 57% for *M. pallidipennis*, 38% for *T. lecticularia* and 76% for *R. prolixus*. The expression of MHC-II, CD40 and CD86 in DCs was differentially modulated depending on the saliva from each species. Regarding maturation, saliva differentially inhibited the expression of MHC-II, CD40, CD80 and CD86 in LPS-matured DCs but the CD40 molecule was the only inhibited by the saliva of the four species. Except for the saliva of *R. prolixus*, that induced IL-6 cytokine production, TNF- α , IL-12 and IL-6 were inhibited and IL-10 was increased in the saliva of the other three species tested. It is noteworthy that the saliva, per se, depending on the species, induced the production of IL-12, IL-6 and IL-10. The saliva of *R. prolixus* was the only one that induced DCs apoptosis. The presence of PGE₂ in the saliva of the four evaluated triatomines was not detected. These results demonstrate that triatomines saliva has molecules that modulate the biology of DCs and this effect is PGE₂-independent. We believe that the decrease in differentiation, the modulation of stimulatory and co-stimulatory molecules and the inhibition of pro-inflammatory cytokines and the induction of IL-10 generates a much less aggressive environment for the feeding that could also facilitate the transmission of pathogens, including *T. cruzi*.

Key-words: Triatomines. Saliva. Dendritic cells. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Triatomíneos avaliados e obtenção das glândulas salivares.	43
Figura 2. Manutenção das colônias de triatomíneos.	44
Figura 3. Fenograma obtido a partir do perfil eletroforético de proteínas salivares de triatomíneos.	52
Figura 4. Diferenciação de CDs ao longo dos sete dias de cultura.	53
Figura 5. Padronização da diferenciação de CDs.	54
Figura 6. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a diferenciação de CDs.	56
Figura 7. A saliva dos triatomíneos das espécies <i>P. herreri</i> , <i>T. lecticularia</i> e <i>R. prolixus</i> inibem a expressão da molécula de superfície MHC II em CDs diferenciadas na presença de saliva.	58
Figura 8. A saliva dos triatomíneos das espécies <i>P. herreri</i> , <i>M. pallidipennis</i> e <i>T. lecticularia</i> inibe a expressão da molécula de superfície CD40 em CDs diferenciadas na presença de saliva.	59
Figura 9. Efeito da saliva de diferentes triatomíneos na expressão da molécula de superfície CD86 em CDs diferenciadas na presença de saliva.	60
Figura 10. A saliva dos triatomíneos estudados não altera a expressão de CD11c e CD11b em de CDs já diferenciadas.	62
Figura 11. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a produção de TNF- α em CDs estimuladas com LPS.	65
Figura 12. A saliva dos triatomíneos avaliados modula a produção de IL-6 em CDs estimuladas com LPS.	66
Figura 13. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a produção de IL-12p40 por CDs estimuladas com LPS.	67

- Figura 14. A saliva dos triatomíneos avaliados aumenta a produção de IL-10 em CDs estimuladas com LPS. 68
- Figura 15. Efeito da saliva de diferentes triatomíneos sobre a produção de citocinas em CDs imaturas. 69
- Figura 16. Efeito da saliva de diferentes triatomíneos na expressão da molécula de superfície MHC-II em CDs estimuladas com LPS. 71
- Figura 17. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a expressão da molécula de superfície CD40 em CDs estimuladas com LPS. 72
- Figura 18. A saliva do triatomíneo *P. herreri* inibe a expressão da molécula de superfície CD86 em CDs estimuladas com LPS. 73
- Figura 19. A saliva dos triatomíneos das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis*, e *T. lecticularia* inibe a expressão da molécula de superfície CD80 em CDs estimuladas com LPS. 74
- Figura 20. Avaliação do efeito da saliva na indução de apoptose em CDs. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração média proteica da saliva de triatomíneos

51

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
CD	Cluster of differentiation
CDs	Células Dendríticas
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
IL	Interleucina
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NPS	Nitroforinas
NO	Óxido Nítrico
PBS	Solução de fosfato tamponada
PGE₂	Prostaglandina-E ₂
RPMI	Meio de cultura RPMI 1640
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	TRIATOMÍNEOS	22
2.2	TRIATOMÍNEOS DE INTERESSE NO PRESENTE TRABALHO	24
2.2.1	<i>Panstrongylus herreri</i> (WYGODZINSKY, 1948)	24
2.2.2	<i>Meccus pallidipennis</i> (Stal, 1872)	25
2.2.3	<i>Triatoma lecticularia</i> (Stal, 1859)	27
2.2.4	<i>Rhodnius prolixus</i> (Stal, 1859)	27
2.3	HEMATOFAGIA E BIOMOLÉCULAS PRESENTES NA SALIVA	28
2.4	CÉLULAS DENDRÍTICAS	33
2.5	IMUNOMODULAÇÃO DE CD _s PELA SALIVA DE ARTRÓPODES HEMATÓFAGOS	34
3	JUSTIFICATIVA	36
4	OBJETIVOS	38
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	41
5.1.1	Cultura de células	41
5.1.2	Tampão de lise	41
5.1.3	Anticorpos monoclonais utilizados para citometria de fluxo	41
5.2	TRIATOMÍNEOS UTILIZADOS	41
5.3	MANUTENÇÃO DOS INSETOS	42
5.4	COLETA DE SALIVA	42
5.5	CONCENTRAÇÃO PROTEICA DA SALIVA	45

5.6	DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DA SALIVA	45
5.7	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA-E ₂ (PGE ₂)	45
5.8	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	46
5.9	SUBMISSÃO DO PROJETO PARA AVALIAÇÃO PELA CEUA	46
5.10	DIFERENCIAÇÃO DE CD _s	46
5.11	FENOTIPAGEM DE CD _s	47
5.12	DOSAGEM DE CITOCINAS	47
5.13	EFEITO DA SALIVA SOBRE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE CD _s	48
5.14	EFEITO DA SALIVA SOBRE A EXPRESSÃO DE CD11c e CD11b EM CD _s JÁ DIFERENCIADAS	48
5.15	EFEITO DA SALIVA SOBRE A MATURAÇÃO DE CD _s	48
5.16	EFEITO DA SALIVA SOBRE A APOPTOSE DE CD _s	49
5.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6	RESULTADOS	50
6.1	CONCENTRAÇÃO PROTEICA	51
6.2	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	51
6.3	DIFERENCIAÇÃO DE CD _s	52
6.4	EFEITO DA SALIVA NA DIFERENCIAÇÃO DE CD _s	55
6.5	EFEITO DA SALIVA SOBRE A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ESTIMULADORAS E CO-ESTIMULADORAS EM CD _s DIFERENCIADAS NA PRESENÇA DE SALIVA	57
6.6	EFEITO DA SALIVA NA EXPRESSÃO DE CD11c e CD11b EM CD _s JÁ DIFERENCIADAS	61
6.7	EFEITO DA SALIVA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CD _s ESTIMULADAS COM LPS	63
6.8	EFEITO DA SALIVA SOBRE A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ESTIMULADORAS E CO-ESTIMULADORAS EM CD _s ESTIMULADAS COM LPS	70

6.9	EFEITO DA SALIVA NA INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CDS	75
6.10	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA-E ₂ (PGE ₂)	77
7	DISCUSSÃO	78
8	CONCLUSÕES	85
9	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), popularmente conhecidos como barbeiros, são ectoparasitas hematófagos de grande relevância médica, social e econômica. Esses ectoparasitos são hematófagos durante todos os estágios de vida (estágios ninfais e fase adulta) e obtêm o sangue diretamente dos vasos do hospedeiro vertebrado (LAVOIEPIERRE; DICKERSON; GORDON, 1959). Durante todo o processo de hematofagia há constante deposição de saliva, seja esta fora ou no interior dos vasos sanguíneos (SOARES *et al.*, 2006). A saliva e os movimentos das peças bucais no hospedeiro desencadeiam respostas fisiológicas de reparo, como agregação plaquetária, constrição do vaso lesado, coagulação sanguínea, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia dos leucócitos. Neste contexto, a fim de permitir um repasto eficiente, é sugerido que a saliva apresente várias substâncias que antagonizam os sistemas hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro vertebrado.

No que se refere à presença de moléculas que antagonizam o sistema hemostático de defesa dos seus hospedeiros, diversos trabalhos vêm mostrando a presença de substâncias na saliva de triatomíneos com atividades vasoconstrictoras, inibidoras da agregação e ativação plaquetária e anti-coagulantes (FONTAINE *et al.*, 2011; DE ARAUJO *et al.*, 2012). No caso de componentes imunomoduladores poucas moléculas foram caracterizadas até o momento. Nesse caso específico, já foi mostrado que a espécie *R. prolixus* é capaz de produzir uma classe de proteínas ligadoras de histamina denominada de nitroforinas. Isto parece ser muito importante durante a hematofagia, já que a liberação de histamina por basófilos e mastócitos pode induzir reação inflamatória com aumento da permeabilidade vascular, exsudação plasmática e indução de prurido no local da picada, poucos minutos após fixação do ectoparasito (RIBEIRO; WALKER, 1994; WEICHSEL *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2000). Mais recentemente foi mostrado também que essa mesma espécie é capaz de secretar lisofosfatidilcolina, uma molécula lipídica presente na saliva e que pode ter papel importante na modulação de macrófagos e facilitação da transmissão de *T. cruzi* para o hospedeiro (MESQUITA *et al.*, 2008; SILVA-NETO *et al.*, 2012).

Apesar de não ter identificado a molécula, substâncias presentes no intestino e glândulas salivares de três diferentes espécies de triatomíneos foram capazes de modular a atividade do sistema complemento (BARROS *et al.*, 2009). Em resumo, apesar dos poucos estudos relacionados com a resposta imune do hospedeiro é provável que o número de moléculas com potenciais propriedades sobre células e moléculas do sistema imune produzidas pelos triatomíneos possa ser muito maior que as poucas descritas até agora, fato

que pode ser facilmente confirmado nos trabalhos de proteoma, sialoma e transcriptoma de algumas espécies já estudadas (ARAUJO *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2007; ASSUMPCAO *et al.*, 2008; LOPEZ-ORDONEZ *et al.*, 2009; ASSUMPCAO *et al.*, 2011; BUSSACOS *et al.*, 2011).

As células dendríticas (CDs), presentes em diferentes tecidos incluindo a pele, constituem uma população de leucócitos altamente especializada em reconhecer, capturar, processar e apresentar antígenos. Uma vez que CDs são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), são amplamente conhecidas como “células apresentadoras profissionais”. A capacidade de apresentação de antígenos por estas células constitui etapa fundamental na estimulação de linfócitos T e B “naives” contra os mais diversos agentes agressores, eliminação de timócitos auto reativos e/ou indução de tolerância (STEINMAN, 1991; CELLA ; SALLUSTO ; LANZAVECCHIA, 1997; BANCHEREAU ; STEINMAN, 1998; ARDAVIN *et al.*, 2001).

É sabido, desde muitos anos atrás, que a resposta imune contra artrópodes hematófagos é um fenômeno adquirido (TRAGER, 1939) e essa resposta parece depender da atividade das células apresentadoras de antígenos (particularmente CDs na epiderme) (BROSSARD; WIKEL, 2004). Na tentativa de evadir destas respostas, estes ectoparasitos, ao longo da sua evolução passaram a produzir diferentes moléculas com propriedades sobre a biologia dessas células (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009; SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). Concordando com essa premissa, é sabido também que, mesmo que infestando seus hospedeiros por poucos minutos, carrapatos, mosquitos e flebotomíneos produzem moléculas capazes de modular essa população de leucócitos (SCHNEIDER *et al.*, 2004; SCHNEIDER ; HIGGS, 2008; SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010; CARREGARO *et al.*, 2011). Como já discutido anteriormente, no caso dos triatomíneos, pesquisas nesse campo ainda estão se iniciando e, no caso de CDs, nenhuma molécula da saliva foi identificada e caracterizada.

Em resumo, apesar de haver dados na literatura mostrando o efeito modulador de moléculas salivares de triatomíneos sobre o sistema hemostático, estudos avaliando seus efeitos sobre as células do sistema imune ainda são escassos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da saliva dos triatomíneos *Panstrongylus herreri*, *Meccus pallidipennis*, *Triatoma lecticularia* e *Rhodnius prolixus*, espécies pertencentes aos gêneros de maior importância epidemiológica, sobre a biologia de CDs. Para tanto investigamos os efeitos da saliva sobre a diferenciação (expressão de CD11c e CD11b), maturação (expressão das moléculas co- e estimuladoras e produção de citocinas) e indução de apoptose de CDs derivadas de células de medula óssea de camundongos, com o auxílio de técnicas como

citometria de fluxo e ELISA. Além disso, outro objetivo foi avaliar a presença de prostaglandina-E₂ (PGE₂) na saliva como possível responsável pelos efeitos observados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRIATOMÍNEOS

Triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à classe Insecta, ordem Hemíptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). A subfamília Triatominae é dividida em cinco tribos, (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini), e organizada em 18 gêneros, sendo que até 2012, englobava um total de 142 espécies, encontradas principalmente na América Latina (GURGEL-GONCALVES *et al.*, 2012). Dependendo da região, os triatomíneos podem receber diferentes denominações, geralmente relacionado aos seus hábitos alimentares, por exemplo, no Brasil é popularmente conhecido como barbeiro, furão, chupão, bicudo ou fincão (SCHOFIELD; GALVAO, 2009).

Os triatomíneos possuem ampla distribuição geográfica. Na região Neotropical ocupam desde os Grandes Lagos da América do Norte até à província de Chubut no Sul da Argentina (Lat. 42 N e 46 S) (SCHOFIELD; GALVAO, 2009). Fora da América, são encontrados na África, Ásia e Austrália, sendo que, sete espécies são encontradas exclusivamente na África e Ásia, e o gênero *Linshcosteus*, único gênero extra americano, é encontrado apenas na Índia (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GORLA; DUJARDIN; SCHOFIELD, 1997; SCHOFIELD; GALVAO, 2009).

Das 142 espécies conhecidas, 62 ocorrem no Brasil e 63% (39) dessas espécies são exclusivamente brasileiras. Todas as regiões brasileiras são favoráveis para o crescimento dos triatomíneos, sendo os biomas caatinga e cerrado os que apresentam o maior número de diversidade. A região brasileira com maior número de espécies de triatomíneos é o nordeste, sendo o estado da Bahia o que tem maior quantidade, 25 espécies descritas, seguida por Mato Grosso (centro-oeste) com 18 espécies, Pará (norte), Tocantins (norte) e Minas Gerais (sudeste) com 15 espécies (GURGEL-GONCALVES *et al.*, 2012).

A primeira evidência sobre a existência de triatomíneos na América do Sul foi feita em 1590 e atribuída ao Pe. Reginaldo Lizarrága que durante visitas há conventos no Peru e Chile descreveu os triatomíneos como sendo grandes insetos que atacavam à noite (GALVÃO, 2003). A primeira espécie a ser descrita, foi feita por De Geer, em 1773, como *Cimex rubrofasciatus*. Posteriormente essa espécie passou a ser chamada de *Triatoma rubrofasciata*, e foi considerada desde então como a espécie-tipo do gênero *Triatoma* (GALVÃO, 2003).

Os triatomíneos são insetos hemimetábolos, ou seja, sofrem metamorfose incompleta. Seu ciclo biológico compreende as formas de ovo, ninfa (cinco estádios) e adulto. O ovo

possui coloração e formas variadas e pode ser usado como ferramenta para classificação taxonômica (OBARA *et al.*, 2007; OBARA *et al.*, 2007; VILLALOBOS *et al.*, 2012). As ninfas se diferem dos adultos devido à ausência de asas e de um aparelho reprodutor desenvolvido e apto à reprodução. Os adultos das diferentes espécies possuem tamanho variando de 5,0 mm, espécie *Alberprosenia goyavargasi* (MARTINÉZ e CARCAVALHO, 1977) a 44,0 mm, espécie *Dipetalogaster máxima* (UHLER, 1894). São insetos considerados lentos, de voo difícil e hábitos noturnos. O ciclo biológico possui tempo variável de 3 a 15 meses, dependendo da espécie e das condições ambientais, como temperatura e fonte alimentar (LENT; WYGODZINSKY, 1979; SILVA; SANTOS; NAKANO, 1993; MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2007; BARRETO-SANTANA *et al.*, 2011; MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2014).

Os triatomíneos possuem importância epidemiológica por serem transmissores dos protozoários: *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. O parasito *T. rangeli* é um protozoário não patogênico para os hospedeiros vertebrados, porém o é para os hospedeiros invertebrados (GUHL; VALLEJO, 2003). Já o parasito *T. cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, descoberta em 1909 por Carlos Chagas, em Minas Gerais, enquanto trabalhava no controle de mosquitos transmissores da malária. Carlos Chagas observou primeiramente que os triatomíneos tinham o hábito de sugar o sangue de moradores da região. Ao examinar esses insetos, notou que estavam parasitados com um protozoário flagelado. Depois, descobriu que os animais também albergavam o parasito. Por fim, ele encontrou em um habitante da região, Berenice, os mesmos parasitos. Descrevendo assim, uma nova doença, o agente causador, os reservatórios e o vetor (GURTLER; DIOTAIUTI; KITRON, 2008; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

A transmissão vetorial do parasito *T. cruzi* se dá através das fezes liberadas pelos triatomíneos durante a alimentação. Portanto, o sucesso na transmissão do parasito depende que o tempo de defecação seja inferior ao tempo de alimentação, isto está relacionado não somente com espécie e estágio de desenvolvimento do triatomíneo, mas também com a quantidade de sangue ingerida e tempo de jejum, quanto maior a quantidade de sangue ingerida mais rápida é a defecação (TRUMPER; GORLA, 1991; GUARNERI *et al.*, 2003). No caso do *T. rangeli*, a transmissão do parasito se dá através da saliva no momento da hematofagia. Acredita-se, nesse caso, que a presença de moléculas da saliva contribui decisivamente para o sucesso da transmissão.

As espécies sinantrópicas e com capacidade de domiciliação possuem maior importância epidemiológica na transmissão vetorial de *T. cruzi*, embora provavelmente todas

tenham capacidade de transmiti-lo (SCHOFIELD; GALVAO, 2009). Assim, os gêneros *Panstrongylus*, *Meccus*, *Triatoma* e *Rhodnius* abrangem a maioria dessas espécies envolvidas nesta transmissão e são considerados, portanto, os gêneros com maior relevância epidemiológica. Através de campanhas de borrifações com inseticidas, populações domiciliares de triatomíneos no Brasil têm sido erradicadas, e com isso, esses nichos ecológicos ficam vagos, e espécies que antes eram estritamente silvestres acabam ocupando-os, destacando assim a importância de estudos que abrangem tanto espécies domiciliares quanto aquelas com potencial de domiciliação (SCHOFIELD; DIOTAIUTI; DUJARDIN, 1999).

2.2 TRIATOMÍNEOS DE INTERESSE NO PRESENTE TRABALHO

No Brasil existem pelo menos 62 espécies de triatomíneos já identificados, sendo que a maioria é silvestre. No insetário do Departamento de Medicina Tropical e Infectologia da UFTM são mantidas diversas espécies de triatomíneos, sendo que nesta pesquisa investigamos quatro espécies. Do gênero *Triatoma*, foi avaliada a saliva da espécie *Triatoma lecticularia*, do gênero *Meccus*, foi avaliada a saliva da espécie *Meccus pallidipennis*, do gênero *Panstrongylus*, a espécie *Panstrongylus herreri* enquanto que do gênero *Rhodnius* a espécie *Rhodnius prolixus*. Essas espécies têm ganhado importância crescente na transmissão do *T. cruzi*, representam uma dentre os quatro principais gêneros da família Reduviidae (*Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Meccus*), estão presentes em diferentes regiões do continente americano e são as espécies que melhor se adaptaram às condições do insetário.

2.2.1 *Panstrongylus herreri* (WYGODZINSKY, 1948)

O triatomíneo *Panstrongylus herreri* também denominado *Panstrongylus lignarius* (WALKER, 1873) (MARCILLA *et al.*, 2002) é uma espécie encontrada em sete países da América do Sul: Peru, Equador, Colômbia, Guiana, Suriname, Venezuela e Brasil. (GALVÃO *et al.*, 2003; PATTERSON ; BARBOSA ; FELICIANGELI, 2009). Sendo que no Brasil, encontra-se geograficamente distribuído entre os estados do Amazonas, Goiás, Maranhão, Pará e Mato Grosso (GALVÃO *et al.*, 2003; PAULA *et al.*, 2013). Os insetos do gênero possuem uma cabeça curta, olhos grandes e inserção da antena próxima a eles (PATTERSON; BARBOSA; FELICIANGELI, 2009). Possuem um tamanho médio variando de 20,5 a 31 mm e coloração que mistura tons de marrom claro e escuro (Fig. 1 A).

É uma espécie predominantemente silvestre, encontrada tanto em florestas tropicais quanto subtropicais, exceto no Peru, onde é uma das principais espécies sinantrópicas e é considerada a principal vetora da doença de Chagas (CUBA *et al.*, 2002; PATTERSON; BARBOSA ; FELICIANGELI, 2009). Ocupa palmeiras, ocos e copas de árvores, ninhos de pássaros e tocas de roedores. No Brasil, na bacia do Amazonas, os adultos movem-se livremente sobre as árvores, camuflados por sua coloração, enquanto as ninfas se refugiam em buracos de árvores (GAUNT; MILES; TEIXEIRA *et al.*, 2001). Ocasionalmente podem ser encontrados em ambientes fechados ou em galinheiros, atraídos principalmente pela luz.

No Brasil, o primeiro relato de *P. herreri* naturalmente infectado com tripanosomatídeos foi feito em 1949. Os triatomíneos foram capturados no estado do Pará, em alturas de 5 a 15m, sugerindo que na natureza esses triatomíneos alimentam-se de animais arborícolas. Com esses insetos capturados, o grupo montou uma pequena colônia e acompanhou o desenvolvimento desde a postura dos ovos até o surgimento dos adultos, com isso observaram um ciclo evolutivo de aproximadamente 179 dias, aproximadamente 6 meses (DEANE; DAMASCENO, 1949).

Em 2001, um levantamento da fauna triatomínica em uma comunidade amazonense localizada no estado do Maranhão demonstrou que dentre os triatomíneos da espécie *P. herreri*, 27% estavam naturalmente infectados com o parasito *T. cruzi*. De uma forma geral, este estudo observou que das 19 espécies silvestres encontradas, 11 estavam naturalmente infectadas com o *T. cruzi*, demonstrando a necessidade de estudos e vigilância sobre essas espécies silvestres, principalmente em relação às espécies com histórico de domiciliação, como *P. herreri* (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Na região amazônica localizada no Peru, uma quantidade considerável dos triatomíneos da espécie *P. herreri* estavam naturalmente infectados com o *T. cruzi* (62,4%), e dentre os que tiveram as fontes alimentares identificadas, 18,2% tinham se alimentado de sangue humano (PINTO *et al.*, 2008).

2.2.2 *Meccus pallidipennis* (Stal, 1872)

O triatomíneo *Meccus pallidipennis*, anteriormente conhecido como *Triatoma pallidipennis*, foi separado em um novo gênero, *Meccus*, devido ao grande tamanho (CARCAVALLO *et al.*, 2000). As fêmeas possuem tamanho variando de 32 a 35 mm e os machos de 31 a 35mm. Possuem uma coloração escura e inserção da antena semelhante ao gênero *Triatoma*, na porção mediana da cabeça (LENT; WYGODZINSKY, 1979) (Fig. 1 E).

É encontrado em vários estados do México, nas regiões Sul, Leste, Oeste e Central (GALVÃO *et al.*, 2003; BENÍTEZ-ALVA; HUERTA; TÉLLEZ-RENDÓN, 2012). Essa espécie é uma das principais responsáveis pela transmissão vetorial de *T. cruzi* nessa região. Sendo que juntamente com outras seis espécies do gênero *Meccus* são responsáveis por um total de 74% da transmissão de *T. cruzi*. (MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2012). Em um levantamento epidemiológico realizado de 2006 a 2010, 61,39% dos exemplares de *M. pallidipennis* capturados em varias regiões do México, estavam naturalmente infectados com o parasito *T. cruzi* (BENÍTEZ-ALVA; HUERTA; TÉLLEZ-RENDÓN, 2012).

Triatomíneos da mesma espécie, oriundos de regiões geograficamente diferentes, podem possuir diferenças quanto a parâmetros biológicos, como ciclo de vida, resultado da influência das variações nas condições ambientais. Assim, três colônias, recém-estabelecidas, oriundas de diferentes regiões do México apresentaram variações quanto ao ciclo de vida, taxa de alimentação e quantidade de ovos por fêmea, sendo que a colônia originada da região mais quente e úmida reuniu as características mais favoráveis a transmissão do *T. cruzi*, como menor tempo no ciclo biológico e maior quantidade de ovos por fêmeas (MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2014). De uma forma geral, *M. pallidipennis* possui um ciclo biológico relativamente curto (mais ou menos cinco meses), o que favorece o surgimento de grandes populações em um curto espaço de tempo, além de uma alta taxa de ovos por fêmea e uma baixa mortalidade, fatores que aumentam a sua incidência e dispersão e conseqüentemente a sua importância na transmissão vetorial de *T. cruzi* (MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2014).

Outra característica importante para o sucesso na transmissão do parasito é o tempo de defecação, que deve ser menor do que o tempo de alimentação. *M. pallidipennis* possui um período de alimentação variando aproximadamente de 10 a 20 minutos, dependendo do estágio de desenvolvimento, e um tempo de defecação inferior a 10 minutos com variação aproximada de 3 a 9 minutos, assim a defecação ocorre com o vetor ainda no hospedeiro vertebrado (MARTÍNEZ-IBARRA; NOVELO-LÓPEZ, 2004).

Um estudo sobre a suscetibilidade ao *T. cruzi*, ao avaliar a porcentagem de triatomíneos infectados, a quantidade de parasitos nas fezes e a quantidade de sangue ingerido, concluiu que dentre as espécies estudadas, a espécie *M. pallidipennis* é a mais susceptível à infecção pelo parasito ($M. pallidipennis > T. barberi > T. phyllosoma > T. infestans > R. prolixus$) (ALEJANDRE-AGUILAR *et al.*, 1993).

2.2.3 *Triatoma lecticularia* (Stal, 1859)

Triatoma lecticularia é uma espécie encontrada nos Estados Unidos e no México (GALVÃO *et al.*, 2003). É uma espécie predominantemente silvestre, cuja importância epidemiológica está relacionada com a manutenção do ciclo silvestre do *T. cruzi* (SILVA; SANTOS; NAKANO, 1993). Os insetos da espécie *T. lecticularia* possuem uma coloração mista de vermelho e preto, inserção das antenas na porção medial da cabeça e um tamanho variando de 16 a 23mm (LENT; WYGODZINSKY, 1979) (Fig. 1 I).

Um levantamento epidemiológico sobre triatomíneos silvestres no Texas, Estados Unidos, observou uma ampla distribuição geográfica dos triatomíneos por todo o estado e ainda uma sobreposição de espécies. Verificaram também uma associação dos triatomíneos das espécies *T. lecticularia*, *T. gerstaeckeri* e *T. sanguisuga*, com habitações humanas, sendo que, mais da metade dos espécimes encontrados dentro ou perto de casas estavam infectados com *T. cruzi* (KJOS; SNOWDEN; OLSON, 2009).

Uma das características mais importantes e interessantes desta espécie é a sua facilidade em se adaptar a diversos ambientes, desde regiões úmidas, como matas, a regiões secas, como desertos, além de se adaptar muito bem ao ambiente laboratorial, assim trata-se de uma espécie euritérmica e bastante eclética em relação à alimentação (SILVA; SANTOS; NAKANO, 1993). Um estudo, que comparou três espécies pertencentes ao gênero *Triatoma*, observou que *T. lecticularia* foi a que apresentou o desenvolvimento mais rápido, provavelmente devido a essa facilidade de adaptação, aproximadamente sete meses. Além disso, verificaram uma alta taxa de eclosão dos ovos (>70%) em um período de incubação de aproximadamente 20 dias, o que comprova a existência de condições favoráveis no ambiente laboratorial para o desenvolvimento dos insetos (MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2007).

Além da facilidade de adaptação que culmina com uma grande capacidade de dispersão e da possibilidade de domiciliação, outra característica extremamente importante que inclui a espécie *T. lecticularia* no grupo de potencialmente capazes de transmitir o *T. cruzi* é o fato de possuir um tempo de defecação menor que 10 min (média aproximada de 6 a 9 min) e conseqüentemente inferior ao tempo de alimentação que varia aproximadamente de 19 a 24 min (MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2007).

2.2.4 *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859)

O triatomíneo *Rhodnius prolixus* possui grande importância na transmissão vetorial da doença de Chagas, sendo o principal vetor do *T. cruzi*. É amplamente distribuído entre os

países da América Central (México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Honduras, Nicarágua e Panamá) e da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Venezuela e Brasil) (GALVÃO *et al.*, 2003). No Brasil, há relatos de *R. prolixus* nos estados de Goiás, Pará, Rio de Janeiro e na Amazônia (GALVÃO *et al.*, 2003).

R. prolixus possui um ciclo biológico relativamente rápido, mais ou menos quatro meses, variando de 133 a 159 dias dependendo da temperatura. Temperaturas mais elevadas favorecem um ciclo de desenvolvimento mais rápido (SILVA; SILVA, 1989). Os triatomíneos dessa espécie tendem a estar associados a palmeiras, possuem coloração marrom e assim como os demais insetos do gênero *Rhodnius* possuem cabeça alongada e inserção da antena distante dos olhos. Os machos possuem um tamanho médio variando de 17 a 20 mm e as fêmeas ligeiramente maiores, variam de 19 a 22 mm (LENT; WYGODZINSKY, 1979) (Fig. 1 L).

Durante uma busca por triatomíneos realizada em uma área da Mata Atlântica em Teresópolis, Rio de Janeiro, foram coletados 23 triatomíneos identificados morfologicamente como sendo *R. prolixus*, dos quais 13(56%) estavam infectados por *T. cruzi*. Os triatomíneos foram encontrados em folhas de pteridófitas, ninhos de animais, provavelmente gambás e tronco de palmeiras. Além disso, também encontraram vários ovos aderidos às folhas das pteridófitas (PINHO *et al.*, 1998).

Algumas características da espécie *R. prolixus*, aumentam a sua importância na transmissão do parasito *T. cruzi*, como acentuada antropofilia, rápido ciclo de desenvolvimento, que culmina com uma elevada densidade e uma intensa dispersão, hábito de defecar logo após a alimentação e facilidade em abrigar o *T. cruzi*. Dentre as espécies do gênero *Rhodnius*, apesar das semelhanças, a espécie *R. prolixus* apresenta a maior eficiência alimentar, atingindo valores elevados de ingestão, quando alimentados artificialmente ou em hospedeiros vertebrados. Essas análises comparativas sugerem que as espécies com maiores taxas de ingestão total tendem a alcançar um status nutricional superior, permitindo-lhes atingir maiores densidades (SANT'ANNA *et al.*, 2001).

2.3 HEMATOFAGIA E BIOMOLÉCULAS PRESENTES NA SALIVA

A obtenção do sangue pelos triatomíneos é feita por canulação direta dos vasos sanguíneos do hospedeiro vertebrado através do auxílio de uma estrutura muscular localizada na cabeça do inseto chamada de bomba cibarial (LAVOPIERRE; DICKERSON; GORDON, 1959; ARAUJO *et al.*, 2011). A primeira fase envolvida no processo de alimentação é

chamada de sondagem, e ocorre através da perfuração da pele pelas mandíbulas e subsequente oscilação das maxilas até a penetração nos vasos; a segunda fase é chamada de ingurgitamento e trata-se da ingestão de sangue propriamente dita. Durante todo o processo de alimentação ocorre liberação de saliva, que serve tanto para lubrificar as partes bucais quanto para a obtenção de sangue, a liberação é feita tanto nos tecidos adjacentes ao vaso, quanto diretamente no vaso, sendo que parte da saliva é ingerida juntamente com o sangue (SOARES *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2014).

A saliva, importante para o processo de alimentação, é produzida pelas glândulas salivares, que são morfológicamente diferentes dependendo do triatomíneo. Possuindo diferenças quanto ao número, tamanho e forma (Fig. 1). As glândulas salivares ficam localizadas na cavidade torácica, junto à parte inicial do tubo digestivo. No gênero *Rhodnius*, as glândulas são vermelhas, e em dois pares, um par principal e um acessório (MEIRELLES *et al.*, 2003). Já as glândulas salivares dos gêneros *Panstrongylus*, *Meccus* e *Triatoma* são formadas por três pares, sendo chamadas de D1, D2 e D3, com coloração variando de branco leitosa a um pouco amarelada (BARTH, 1954).

O processo de alimentação desencadeia no hospedeiro vertebrado uma série de eventos que não somente os triatomíneos, mas, todos os artrópodes hematófagos precisam enfrentar para uma alimentação bem sucedida. Fazem parte desses eventos: o sistema hemostático, que inclui a ativação plaquetária, a cascata da coagulação e a vasoconstricção; e o sistema imune. Portanto, para que consigam completar sua alimentação, a saliva desses artrópodes precisa conter um arsenal de moléculas com atividade que contraponha esses sistemas (RIBEIRO, 1987; RIBEIRO, 1995; SÁ-NUNES ; OLIVEIRA, 2010; FONTAINE *et al.*, 2011; DE ARAUJO *et al.*, 2012).

Frente à vasoconstricção, um dos primeiros eventos desencadeados logo após o dano tecidual, a saliva dos artrópodes hematófagos reagem de duas formas, através de moléculas que bloqueiam as substâncias vasoconstrictoras liberadas pelo hospedeiro vertebrado ou ainda através da produção de moléculas vasodilatadoras. O triatomíneo da espécie *R. prolixus* opõe a vasoconstricção através da substância vasodilatadora óxido nítrico (NO), que devido a instabilidade é carregada por moléculas bastante estudadas na saliva desses triatomíneos, denominadas de nitroforinas (NPs), até o momento sete são conhecidas (NP1 a NP7) (CHAMPAGNE; NUSSENZVEIG; RIBEIRO, 1995; MOREIRA *et al.*, 2003; KNIPP *et al.*, 2007). As NPs ao serem depositadas, juntamente com a saliva nos vasos sanguíneos dos hospedeiros vertebrados, devido a mudança de pH, liberam o conteúdo de NO, que leva a vasodilatação (MONTFORT; WEICHSEL; ANDERSEN, 2000).

Para inibir a agregação plaquetária, mecanismo utilizado pelo hospedeiro vertebrado para conter a perda sanguínea, vários artrópodes hematófagos possuem em sua saliva apirases, que são enzimas que hidrolisam a adenosina-difosfato (ADP), um dos agentes agregantes, liberados durante o dano celular e ativação plaquetária (RIBEIRO *et al.*, 1984; RIBEIRO; VAUGHAN ; AZAD, 1990; CHAMPAGNE ; NUSSENZVEIG ; RIBEIRO, 1995; MANS *et al.*, 1998; VALENZUELA *et al.*, 2001). Além de apirases, outras moléculas, que tem como alvo, por exemplo, os agentes agregantes trombina, serotonina ou tromboxano A₂, também participam da inibição plaquetária resultando assim em efeitos redundantes (MANS; LOUW; NEITZ, 2002; MANS; RIBEIRO; ANDERSEN, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2008; ALVARENGA *et al.*, 2010). A saliva do triatomíneo *R. prolixus* além da enzima apirase (SARKIS; GUIMARAES; RIBEIRO, 1986) possui em sua composição uma molécula que se liga diretamente ao ADP, denominada Inibidor de Agregação do *R. prolixus* -1(RPAI-1) (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000). *T. infestans*, também, além de apirases (FAUDRY *et al.*, 2004; FAUDRY *et al.*, 2006) possui inibidores de agregação plaquetária induzida por colágeno, denominados de triplatin, sendo esse o primeiro relato de moléculas salivares causando inibição de agregação plaquetária induzida por colágeno (MORITA *et al.*, 2006). Já o triatomíneo *M. pallidipennis* possui em sua saliva uma molécula denominada triabina que inibe a agregação através de interação com o agente agregante trombina (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1995).

Em relação à cascata da coagulação, necessária para a estabilização do tampão plaquetário, por se tratar de uma sequência de reações, uma variedade de moléculas atuam na sua inibição e em vários pontos, resultando assim em uma maior eficiência inibitória. Neste sentido, um mesmo artrópode hematófago possui em sua saliva mais de uma molécula com o mesmo objetivo final. A saliva do mosquito *Anopheles stephensi*, por exemplo, possui duas moléculas anti-coagulantes, hamadarin e anophensin, inibidoras da via-intrínseca da coagulação (ISAWA *et al.*, 2002; ISAWA *et al.*, 2007). O triatomíneo *Triatoma infestans* também possui em sua saliva moléculas com atividade anti-coagulante, denominadas como triapsina e triafestinas (AMINO; TANAKA; SCHENKMAN, 2001; ISAWA *et al.*, 2007). Uma das nitroforinas, NP₂, encontradas na saliva de *R. prolixus*, além da atividade de vasodilatação, também inibe a via-intrínseca da coagulação (RIBEIRO; SCHNEIDER; GUIMARAES, 1995).

O outro sistema que os artrópodes precisam enfrentar é o sistema imune, responsável pela defesa contra patógenos e por promover o reparo tecidual. É classicamente dividido em resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune inata, primeira a se manifestar, é formada

por um conjunto de células, como por exemplo, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas e componentes solúveis, como citocinas, quimiocinas, peptídeos e proteínas do sistema complemento (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). A resposta imune adaptativa, responsável pela memória imunológica, é montada através da atuação de linfócitos B, produtores de anticorpos (resposta imune humoral), e linfócitos T (resposta imune celular) (MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2005; BLUESTONE *et al.*, 2009). É neste cenário que os artrópodes hematófagos se alimentam, assim desde o primeiro contato após a transposição da barreira física, células da resposta imune inata residentes na pele podem entrar em contato com partes bucais e proteínas salivares e posteriormente uma resposta imune adaptativa pode ser montada, e resultar, por exemplo, na produção de anticorpos contra proteínas salivares que podem neutralizá-las e dificultar o processo de alimentação.

A maioria das moléculas salivares com atividade imunomoduladora conhecidas pertencem aos carrapatos, principalmente porque estes artrópodes permanecem por longos períodos aderidos aos seus hospedeiros e, portanto são dependentes de uma forte atividade imunossupressora. Assim as proteínas salivares destes artrópodes atuam em diferentes componentes da resposta imune, por exemplo, inibem o sistema complemento, modulam a função e ativação de células como macrófagos, CDs e linfócitos e alteram a produção de citocinas com o objetivo de conseguirem sucesso na alimentação (SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010).

O sistema complemento é formado por uma cascata proteolítica de no mínimo 35 proteínas (incluindo enzimas e seus reguladores) com o objetivo final de destruir organismos através da montagem de um complexo lítico em sua superfície (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009; ZIPFEL; SKERKA, 2009). Esse sistema pode ser ativado por quatro diferentes vias: 1ª) via clássica de ativação - desencadeada pelo componente C1q ao se ligar a anticorpos ligados a antígenos ou a proteínas C reativas; 2ª) via alternativa - ativada pela clivagem espontânea do componente C3 (GASQUE, 2004); 3ª) via da lectina - ativada pela ligação de lectinas ou ficolinas a carboidratos presentes na superfície de patógenos (IP *et al.*, 2009); 4ª) via de ativação pela ação de trombina (HUBER-LANG *et al.*, 2006). Essas diferentes vias convergem para a formação de um complexo lítico de ataque à membrana (MAC) (GUO; WARD, 2005).

A primeira molécula isolada da saliva de carrapato com atividade sobre o sistema complemento foi denominada de ISAC (*Ixodes scapularis* anticomplement molecule) e isolada da saliva de *Ixodes scapularis*. Ela inibe a via alternativa de ativação, por evitar a

ligação do C3b ao fator B ou por remover o fator B já ligado ao C3b (VALENZUELA *et al.*, 2000). Posteriormente a ela, varias outras substâncias com atividade anticomplemento foram identificadas na saliva de carrapatos (RIBEIRO *et al.*, 2006; TYSON *et al.*, 2007; COUVREUR *et al.*, 2008; TYSON; ELKINS; DE SILVA, 2008). Em relação aos triatomíneos, em 2003, foi demonstrado que a saliva dos triatomíneos *Pantronygylus megistus*, *Triatoma brasiliensi* e *R. prolixus* modulavam a ativação do complemento através da inibição da via clássica de ativação. Já em 2009 foi demonstrado que a saliva dos triatomíneos *T. infestans*, *T. brasiliensi* e *R. prolixus* além de inibirem a via clássica atuam também na via alternativa. A saliva desses triatomíneos inibem a deposição do fator C3b e não interferem no fator C1q, além disso a saliva do *T. brasiliense* é a única que inibe a deposição do fator C4b (CAVALCANTE; PEREIRA; GONTIJO, 2003; BARROS *et al.*, 2009).

Outro mecanismo modulado pela saliva dos artrópodes hematófagos é a liberação de histamina. Mastócitos e basófilos residentes na pele mediante dano tecidual, por exemplo, causado durante a hematofagia, liberam histamina que induz uma resposta inflamatória que culmina com o aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma, o que induz o hospedeiro a tentar remover o agente causador. Moléculas com capacidade de ligação à histamina já foram descritas em carrapatos, mosquitos e também triatomíneos (SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). Nos triatomíneos, as NPs, presentes na saliva do *R. prolixus*, após liberação do NO, deixam livres um sítio de ligação, que então é ocupado pela molécula de histamina (MONTFORT; WEICHSEL; ANDERSEN, 2000; ANDERSEN *et al.*, 2005).

Além de NPs, a saliva de *R. prolixus* possui uma molécula chamada lisofosfatidilcolina (LPC) que foi descrita a primeira vez devido aos seus efeitos anti-hemostáticos, posteriormente verificou-se que ela era capaz de modular macrófagos (GOLODNE *et al.*, 2003; MESQUITA *et al.*). A presença de LPC ou de saliva aumentou em cinco vezes a associação de macrófagos com *T. cruzi*, além de aumentar até seis vezes a parasitemia sanguínea em camundongos, demonstrando assim a influência da saliva na transmissão do *T. cruzi* (MESQUITA *et al.*, 2008). A LPC exerce efeito quimiotático sobre os macrófagos que após serem atraídos para o local de inoculação da saliva, tem seu cálcio intracelular aumentado e produção de óxido-nítrico inibida, ações que em conjunto resultam no aumento da associação entre macrófagos e *T. cruzi* e aumento da parasitemia (MESQUITA *et al.*, 2008; SILVA-NETO *et al.*, 2012).

2.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As CDs são células que capturam, processam, e apresentam antígenos. Assim são as responsáveis por fazerem a ligação entre resposta imune inata e adaptativa. Além disso, são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos (APCs). Foram descritas pela primeira vez em 1973 por Steinman e Cohn em estudos avaliando órgãos linfoides secundários de camundongos em que observaram células estreladas aderidas a superfícies plásticas e de vidro (STEINMAN; COHN, 2007). As CDs podem assumir diferentes morfologias e apresentam projeções citoplasmáticas longas e curtas, característica que deu origem a seu nome (do grego “dendron” - árvore), além de cromatina frouxa, núcleo lobulado e citoplasma grande e claro (STEINMAN; COHN, 2007). São células amplamente distribuídas, sendo encontradas em tecidos periféricos não linfoides, tais como pele, trato gastrointestinal, urogenital e respiratório, órgãos sólidos tais como fígado e coração (SOZZANI, 2005; BONASIO; VON ANDRIAN, 2006).

As CDs estão em constante migração mesmo ainda na forma imatura, o que permite que exerçam seu papel de vigilância quanto à presença de agentes agressores, físicos, químicos e biológicos. Durante processo inflamatório essa migração se intensifica com o intuito de otimizar o processo de apresentação antigênica (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1999; BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003).

A interação entre antígenos e CDs se dá através do contato de padrões moleculares (PAMPs), moléculas compartilhadas com grupos de organismos, com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores do tipo Toll (TLRs) (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; KAISHO; AKIRA, 2003). Após essa interação, ocorre à maturação dessas células, processo que cursa com a produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-12 e ainda com o aumento da expressão de moléculas estimuladoras (MHC) e co-estimuladoras em sua superfície, como CD40, CD80 e CD86 (KAPSENBERG, 2003).

Uma vez iniciado o processo de maturação e o processamento antigênico essas células migram para os órgãos linfoides secundários, especialmente linfonodos, onde realizaram a apresentação antigênica para células T naive, fazendo assim um elo entre imunidade inata e adaptativa (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Esse processo de migração é coordenado através da atuação de várias quimiocinas, receptores de quimiocinas e moléculas de adesão. Por exemplo, CDs imaturas possuem em sua superfície os receptores CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR1 e após ativação aumentam a expressão dos receptores CCR7 que as auxiliam na migração para os linfonodos, onde a concentração de CCL-19 e CCL-21 está aumentada

(SOZZANI *et al.*, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1998; SOZZANI, 2005). Nos tecidos linfoides secundários, interagem com linfócitos T, e juntamente com fatores como padrão de citocinas e natureza do antígeno, determinam que tipo de perfil de resposta imune será montado, seja por exemplo uma resposta do tipo Th1, Th2 ou Th17 (KALINSKI *et al.*, 1999).

As CDs podem ser divididas em subtipos de acordo com o local de origem, distribuição tecidual, tipo de moléculas de superfície que possui e funções especializadas (SHORTMAN; CAUX, 1997; LIU, 2001; IWASAKI, 2007). Podem ainda ser divididas em CDs linfoides ou mieloides (SHORTMAN; LIU, 2002) e dependendo da localização podem receber diferentes denominações, por exemplo, na pele são denominadas de células de Langerhans.

Após a descoberta da influência das CDs no curso da resposta imune nos diferentes tecidos onde elas se encontram, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de se avaliar como se dá a interação dessas células com micro-organismos, drogas, toxinas e ectoparasitos, dentre outros.

2.5 IMUNOMODULAÇÃO DE CDs PELA SALIVA DE ARTRÓPODES HEMATÓFAGOS

Por se localizarem na pele, local de hematofagia, as CDs são constantemente moduladas pela saliva de diferentes artrópodes hematófagos. A saliva de diferentes espécies de carrapatos é capaz de inibir a produção de citocinas, como IL-12 e TNF- α e estimular a produção de IL-10. Além disso, exerce efeito inibitório sobre a diferenciação e expressão de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras (CAVASSANI *et al.*, 2005; SA-NUNES *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A saliva de diferentes flebótomos, vetores do protozoário causador da leishmaniose, também é capaz de modular a expressão de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras em CDs, inibindo assim a proliferação de linfócitos T CD₄ o que resulta em uma resposta imune inadequada (CARREGARO *et al.*, 2008). Ao contrário dos efeitos citados, a saliva do vetor do vírus dengue, *Aedes aegypti*, não altera a expressão dessas moléculas em CDs cultivadas com o vírus, mas aumenta a produção das citocinas IL-12p70 e TNF- α , favorecendo assim o recrutamento de outros tipos celulares e atrapalhando a infecção pelo vírus dengue (ADER *et al.*, 2004).

O efeito migratório das CDs também pode sofrer influência da saliva de vetores. Tanto a saliva de carrapatos quanto de mosquitos tem sido descritas alterando a migração dessas

células. A saliva do mosquito *Anopheles stephensi*, vetor do protozoário causador da malária, além de estimular a degranulação de mastócitos, modula a migração de CDs, causando uma hiperplasia em linfonodos (DEMEURE *et al.*, 2005). Já a saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* inibe a migração de células dendríticas imaturas através da inibição da expressão do receptor de quimiocina CCR5, mas não altera a migração de células maturadas para linfonodos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em relação às atividades da saliva de triatomíneos sobre a resposta imune a literatura é bastante escassa e especificamente sobre CDs não há relatos. Neste sentido nosso trabalho busca avaliar o efeito da saliva desses artrópodes nas CDs.

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A pele, local de hematofagia de vários artrópodes, inclusive de triatomíneos, é formada por um conjunto de diferentes células, como macrófagos e CDs, e podem estar sendo moduladas pela saliva destes insetos durante o processo de alimentação. Como as CDs são fundamentais para a montagem da resposta imune contra artrópodes hematófagos é de grande interesse compreender se os triatomíneos evadem das respostas dos hospedeiros mediadas por essas células. Nesse projeto avaliamos o efeito da saliva de quatro espécies de triatomíneos (*Triatoma lecticularia*, *Panstrongylus herreri*, *Rhodnius prolixus* e *Meccus pallidipennis*) sobre a biologia de CDs, sendo que, cada uma das espécies testadas pertence a um dos quatro mais importantes gêneros da família Reduviidae e dependendo da espécie podem ser encontradas em diferentes habitats tais como domésticos, peri-domésticos e silvestres. Os resultados desse trabalho fornecerão base para o entendimento da relação triatomíneo-hospedeiro no sítio de fixação / alimentação e para a possível descoberta de novas moléculas com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 OBEJTIVO GERAL

- Investigar o efeito da saliva de diferentes espécies de triatomíneos sobre a biologia de CDs.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração e o perfil eletroforético das proteínas presentes na saliva dos triatomíneos;
- Avaliar a influência da saliva de triatomíneos na diferenciação de CDs (expressão de CD11c e CD11b e a expressão de moléculas estimuladoras (MHC-II) e co-estimuladoras (CD40 e CD86));
- Avaliar a influência da saliva de triatomíneos na expressão de CD11c e CD11b em CDs já diferenciadas;
- Avaliar a influência da saliva de triatomíneos sobre a expressão de moléculas estimuladoras (MHC-II) e co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e a produção de citocinas (TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10) em CDs maturadas com LPS;
- Avaliar a capacidade da saliva de triatomíneos em induzir apoptose de CDs;
- Avaliar se PGE₂ é um dos constituintes da saliva de triatomíneos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

5.1.1 Cultura de células

As células foram cultivadas na presença do meio RPMI-1640 (GE HEALTH CARE, SUÉCIA) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino inativado (GIBCO, EUA), 50mM de 2-mercaptoetanol (GIBCO), 1mM de piruvato de sódio (SIGMA, EUA), 25mM de bicarbonato de sódio (SIGMA, EUA), 10 mM de HEPES (GIBCO, EUA), 100UI/ml de penicilina (SIGMA, EUA), 100µg/ml de estreptomicina (SIGMA, EUA) e 25mM de L-glutamina (GIBCO, EUA). Após o preparo do meio este foi esterilizado por filtração em capela de fluxo e mantido a 4°C até o uso. Para obtenção de CDs foi adicionado ao meio de cultura, no momento do uso, 25ng/ml de GM-CSF murino (PEPROTECH, EUA) e para estimular a maturação das CDs foi adicionado lipopolissacarídeo – LPS ultra-puro (100ng/ml) obtido de *Escherichia coli* cepa 0111. B4 (INVIVOGEN, EUA).

5.1.2 Tampão de lise

Com a finalidade de lisar as hemácias presentes nas suspensões celulares obtidas a partir da medula óssea de camundongos, foi utilizado tampão de lise constituído de nove partes de solução de cloreto de amônio 0,16 M e uma parte de Tris 0,17 M, filtrado, autoclavado a 120°C e mantido a 4° até o uso.

5.1.3 Anticorpos monoclonais utilizados para citometria de fluxo

Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD11c marcado com FITC, APC ou PeCy7, anti-CD11b marcado com PE, anti-MHCII marcado com PE, anti-CD80 (anti-B7.1), anti-CD86 (anti-B7.2) e anti-CD40 marcados com FITC ou PE, definidos de acordo com a compatibilidade de utilização simultânea de múltiplas marcações (BD PHARMINGEN, EUA).

5.2 TRIATOMÍNEOS UTILIZADOS

Foram utilizados triatomíneos das espécies: *Panstrongylus herreri* (Fig.1-A), *Meccus pallidipennis* (Fig.1-E), *Triatoma lecticularia* (Fig.1-I), e *Rhodnius prolixus* (Fig.1-L),

provenientes de colônias do insetário do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, UFTM.

5.3 MANUTENÇÃO DOS INSETOS

Os triatomíneos foram criados em recipientes cilíndricos de acrílico, forrados com papel filtro e contendo uma tira de cartolina, dobrada em sanfona, para aumentar a superfície interna, fornecer abrigo e permitir o acesso a alimentação (Fig.2). Os potes foram tampados com tecido fino de algodão para permitir o repasto sanguíneo dos insetos que era realizado, a cada sete dias, em galinhas (Fig.2).

5.4 COLETA DE SALIVA

A saliva foi obtida conforme descrito por Mesquita et al. (2008). Triatomíneos, das diferentes espécies, de ambos os sexos e em diferentes dias de jejum (7 a 21 dias) foram limpos com água e etanol e em seguida imobilizados em gelo. Com o auxílio de pinças, os triatomíneos da espécie *R. prolixus* tiveram suas cabeças deslocadas e puxadas permitindo a exposição das glândulas salivares e sua coleta. Para a coleta das glândulas das demais espécies cortou-se a lateral do abdômen e tórax do inseto e após a abertura do mesmo e exposição do conteúdo torácico, através do auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) e pinças, as glândulas foram localizadas e coletadas. As glândulas foram mantidas no gelo durante todo procedimento e a cada três pares de glândulas (três insetos) foram acrescentados 10 µl de solução salina estéril. Com o auxílio de agulhas estéreis essas glândulas salivares foram perfuradas para permitir o extravasamento da saliva e centrifugadas a 11.000 x g por 5 min, sendo o sobrenadante coletado e mantido a -70°C até o momento do uso.

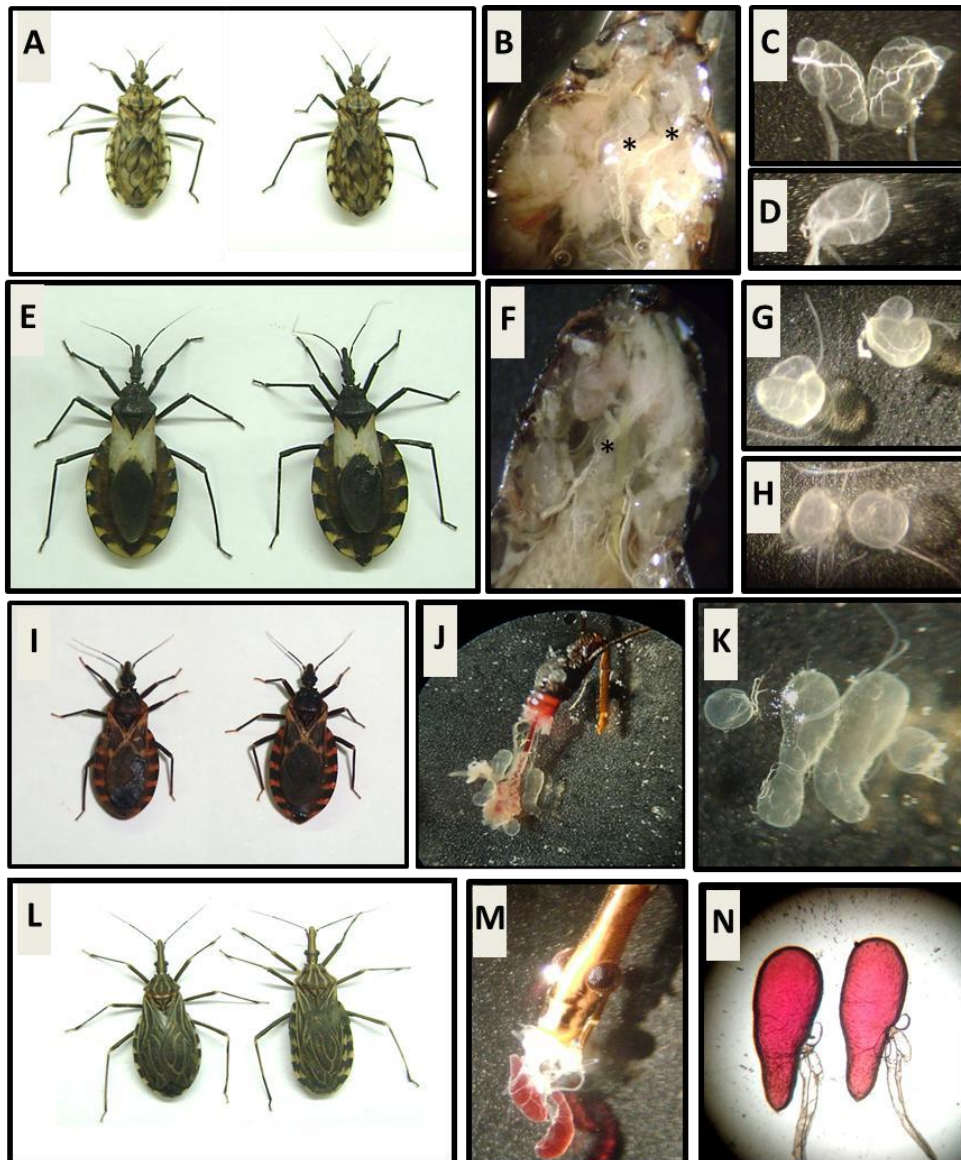


Figura 1. Triatomíneos avaliados e obtenção das glândulas salivares. Foram utilizados triatomíneos das espécies *P. herreri* (A); *M. pallidipennis* (E); *T. lecticularia* (I) e *R. prolixus* (L). Detalhe das glândulas salivares durante a coleta no interior do tórax dos triatomíneos das espécies *P. herreri* (B) e *M. pallidipennis* (F). (*) Localização das glândulas salivares no interior do tórax dos insetos após abertura do abdômen. Glândulas salivares durante a coleta ainda aderidas a cabeça dos triatomíneos das espécies *T. lecticularia* (J) e *R. prolixus* (M). Detalhe das glândulas salivares após a coleta das espécies *P. herreri* (C e D), *M. pallidipennis* (G e H), *T. lecticularia* (K) e *R. prolixus* (N). Fonte: Arquivo pessoal.

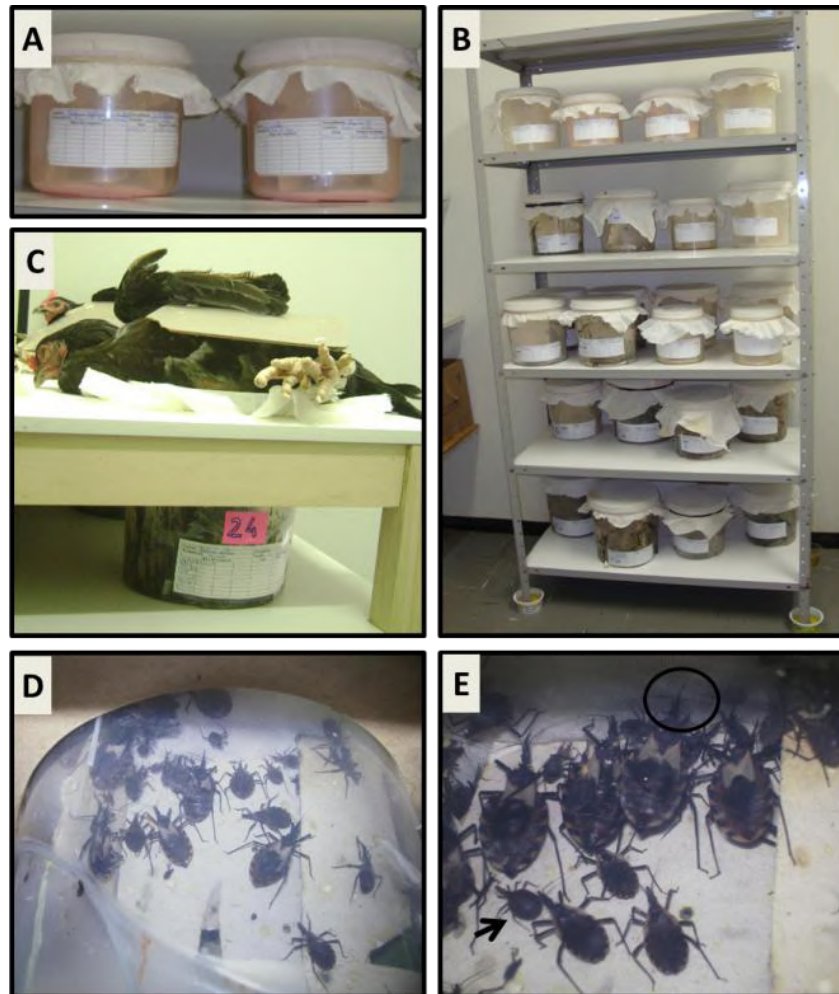


Figura 2. Manutenção das colônias de triatomíneos. Os triatomíneos foram mantidos em recipientes cilíndricos de acrílico, tampados com tecido fino de algodão (A-B), forrados com papel filtro e contendo uma tira de cartolina dobrada em sanfona (D-E). (C) Os insetos eram alimentados a cada sete dias em galinhas. (D-E) Detalhe da disposição dos insetos dentro do recipiente durante o repasto sanguíneo. (E) Circulo: triatomíneo com a probóscide levantada se alimentando; Ponta da seta: triatomíneo ingurgitado. Fonte: Arquivo pessoal.

5.5 CONCENTRAÇÃO PROTEICA DA SALIVA

A concentração proteica da saliva foi determinada pelo método de Bredford, conforme instruções do fabricante (BIO-RAD, EUA). O método consiste na ligação das proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, que causa uma mudança visível de coloração, que inicialmente é castanha passando para diferentes tons de azul, de acordo com a concentração das proteínas. 10µl de cada amostra (diluída 1:10 em água destilada) foram adicionados a 200µl do corante (diluído 1:5 em água destilada), incubados a temperatura ambiente por cinco minutos e a absorbância analisada a 595 nm. A concentração de proteínas foi obtida através da comparação da absorbância com uma curva padrão, com o auxílio do programa StatView (ABACUS, EUA).

5.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DA SALIVA

Para determinar o perfil proteico da saliva das diferentes espécies, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme descrito por Laemmli (1970). A saliva foi diluída em tampão de amostra de eletroforese (Tris-HCl 625 mM, pH 6,8; glicerol 25%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 5%) e em seguida submetida a fervura à 100°C por 5 min. Para definição do volume de saliva a ser utilizado, foi realizada uma eletroforese em gel com molde de cavidades múltiplas de 5 mm, onde foram aplicados separadamente diferentes volumes de saliva, de 0,5 a 2,5 µL. Foi estabelecido um volume de 1µL como o menor volume onde era possível visualizar todas as bandas. A eletroforese iniciou-se com 60 Volts por cerca de 30 minutos e, após a penetração da amostra no gel de separação, a voltagem foi mantida a 120 V até o corante indicador atingir o final do gel. Em seguida, o gel foi corado com o corante azul de Coomassie. Para obtenção do fenograma e inferir a diferença entre o perfil proteico dos isolados, foi utilizado o software GelComparII, versão 5.0. Os coeficientes de similaridade foram calculados pelo algoritmo de Dice.

5.7 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA-E₂ (PGE₂)

A presença de PGE₂ na saliva das espécies foi avaliada através do kit PGE₂ EIA (ENZO LIFE SCIENCES, EUA) conforme instruções do fabricante. Foi colocado em placa disponibilizada pelo kit e já sensibilizada pelo fabricante 100 µl de cada amostra previamente diluída. Em sequência os reagentes foram adicionados na ordem e em quantidade conforme

determinado pelo protocolo do fabricante, 50 µl de conjugado azul e 50 µl do anticorpo amarelo. Logo após, a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação e, ao final, lavada três vezes. Após a lavagem, foram adicionados 200 µl de substrato pNPP e a placa foi novamente incubada por 45 minutos em temperatura ambiente, sem agitação. Depois desse tempo foram adicionados 50 µl de solução de parada, e a absorbância analisada a 405 nm, com correção em 570 nm. A concentração de PGE₂ foi determinada através da comparação com curva padrão.

5.8 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos C57B1/6 *wild-type* criados e mantidos, conforme determina a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), no biotério de experimentação da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.

5.9 SUBMISSÃO DO PROJETO PARA AVALIAÇÃO PELA CEUA

O presente trabalho foi submetido à CEUA com número de protocolo 220 e classificado como aprovado em 2012.

5.10 DIFERENCIAÇÃO DE CD_s

Para a obtenção de CD_s, camundongos eutanasiados tiveram seus fêmures e tíbias retirados. A medula óssea desses ossos coletados foi cultivada em meio RPMI completo suplementado com GM-CSF (25 ng/ml) conforme descrito previamente por Oliveira et al. (2011) com algumas modificações. Após a remoção dos fêmures e tíbias, as epífises foram seccionadas em ambiente estéril e as medulas foram lavadas com RPMI com o auxílio de agulhas e seringa. As células precursoras colhidas foram lavadas e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram incubadas com um tampão de lise, sendo assim submetidos a um novo ciclo de centrifugação e lavagem. Em seguida, as células foram cultivadas na concentração de $2,0 \times 10^6$ células por placa de petri na presença dos fatores de crescimento e 10 ml de meio de cultura RPMI já descritos. No quarto dia de cultura foram adicionados mais 10 ml de meio de cultura suplementado com GM-CSF (50 ng/ml), totalizando 20 ml com concentração de 25 ng/ml. Após sete dias de cultura as células foram coletadas, fenotipadas e analisadas por citometria de fluxo, para determinar a porcentagem de expressão de marcadores de CD_s, tais como, CD11c e CD11b, sendo que os experimentos só eram iniciados após avaliação dessa porcentagem.

5.11 FENOTIPAGEM DE CD_s

As células cultivadas foram analisadas por citometria de fluxo conforme protocolo descrito por Oliveira et al.(2011). As células, após serem retiradas das placas, foram centrifugadas a 400 x g por 10 min. Após descarte do sobrenadante as células foram incubadas com soro de coelho por 30 min a 4°C a fim de minimizar ligações inespecíficas. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais (anti-CD11c, anti-CD11b, anti-MHC II, anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 marcados com APC, FITC, PE ou PECy7 de acordo com o objetivo pretendido) e incubados no escuro por 30 min a 4°C. Após, as células foram lavadas com PBS (2 ml/tubo) e mantidas a 4°C até o momento da aquisição. A aquisição foi realizada em citometro de fluxo FACSCalibur (BD BIOSCIENCES, EUA) e as análises feitas através dos programas Cellquest 5.1 (BD BIOSCIENCES) e FlowJo 10 (TREESTAR, EUA).

5.12 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas IL-12p40, TNF- α , IL-10 e IL-6 foram mensuradas através de kits comerciais específicos, BD OptEIA (BD BIOSCIENCES) por meio de ensaio imunoenzimático ELISA do tipo “sanduíche”. Placas de ELISA de alta afinidade (BD BIOSCIENCES) foram recobertas com 50 μ l/poço de anticorpo de captura específico para as citocinas de interesse, diluídos no tampão de *coating* indicado pelo fabricante para cada citocina, e incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 0,05 % em lavador automático de placas e bloqueadas a temperatura ambiente por 1 hora com 100 μ l de “assay diluent” preparado conforme o fabricante. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, e 50 μ l de amostras (para IL-12 diluição 1:20, IL-6 diluição 1:10 e demais citocinas sem diluição) ou do recombinante de citocinas, foram colocadas para incubação por 3 h a temperatura ambiente. Após nova lavagem foram adicionados 50 μ l do anticorpo de detecção juntamente com peroxidase conjugada com estreptoavidina diluídos em “assay diluent” e incubados por mais 1 h a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas novamente e incubadas com 50 μ l de tetrametilbenzidina (TMB) durante 30 min no escuro. A reação foi interrompida com ácido fosfórico 1M e a absorbância foi medida em 450 nm. A concentração das amostras foi estimada através da comparação das absorbâncias obtidas na curva padrão, obtida através da diluição seriada de citocinas recombinantes murinas. Os resultados foram analisados por regressão linear com o auxílio do programa StatView e expressos em ng/ml ou pg/ml.

5.13 EFEITO DA SALIVA SOBRE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE CD_s

Para avaliar a influência da saliva na diferenciação de CD_s, células coletadas da medula óssea obtidas como descrito anteriormente (item 4.10) na concentração de 2×10^5 células por poço (placa de 48 poços) em um volume inicial de 200 μ l de RPMI 10% com GM-CSF (25ng/ml), foram tratadas com diferentes concentrações de saliva das diferentes espécies (diluição 1:30; 1:100; 1:300 e 1:1000, v/v) nos dias 0 e 3 de cultura. No quarto dia de cultura 200 μ l de RPMI 10% com GM-CSF (50ng/ml) foram adicionados. As células foram avaliadas no sétimo dia por citometria de fluxo quanto à expressão de CD11c, CD11b, MHCII, CD40 e CD86, conforme descrito no item 4.11.

5.14 EFEITO DA SALIVA SOBRE A EXPRESSÃO DE CD11c e CD11b EM CD_s JÁ DIFERENCIADAS

Para avaliar a capacidade da saliva em alterar o fenótipo de CD_s, células no sétimo dia de diferenciação, obtidas como descrito anteriormente (item 4.10), na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço (placa de 96 poços) em um volume de 200 μ l de RPMI 10%, foram incubadas por 18 horas com a saliva dos diferentes triatomíneos (diluição 1:30, v/v) e em seguida avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão de CD11c e CD11b, conforme descrito no item 4.11.

5.15 EFEITO DA SALIVA SOBRE A MATURAÇÃO DE CD_s

Para a avaliação da influência da saliva na maturação de CD_s, células já diferenciadas, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço (placa de 96 poços) em um volume de 200 μ l de RPMI 10%, foram estimuladas com diferentes concentrações de saliva (diluição 1:30; 1:100; 1:300 e 1:1000, v/v) por 1 hora e em seguida com lipopolissacarídeo – LPS (100 ng/ml) por 18 horas. As células então foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão das moléculas estimuladoras e co-estimuladoras MHC-II, CD40, CD80 e CD86 em sua superfície, conforme item 4.11. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e os níveis das citocinas IL-12, IL-6, IL-10 e TNF- α foram dosados por ELISA, conforme item 4.12.

5.16 EFEITO DA SALIVA SOBRE A APOPTOSE DE CD_s

Para avaliar a capacidade da saliva em induzir apoptose, células já diferenciadas, foram submetidas ao ensaio Anexina-V e Iodeto de Propídeo, conforme recomendações do fabricante (BD PHARMIGEM). CD_s na concentração de $1,5 \times 10^5$ de célula por poço (placa de 96 poços) em um volume de 100 μ l de RPMI 10%, foram incubadas com a saliva dos diferentes triatomíneos (diluição 1:30, v/v) por 18 horas. Após esse tempo as células foram retiradas da placa, lavadas duas vezes com tampão PBS e centrifugadas a 400 x g a 4°C por 10 minutos. Em seguida as células foram ressuspensas em tampão de anexina (BD PHARMIGEM) e incubadas por 15 minutos. Após esse tempo, adicionou-se anexina-V conjugada com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídeo. Logo após, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas utilizando os programas Cellquest 5.1 e FlowJo 10. Foram consideradas células viáveis aquelas negativas quanto à marcação com Anexina-V e/ou Iodeto de Propídeo. Como controle positivo de viabilidade celular foram utilizadas CD_s cultivadas na ausência de saliva e como controle positivo de morte celular foram utilizadas células mantidas por 30 minutos a 57°C.

5.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 8 e Graph Pad Prism 5. Primeiramente foram submetidos ao teste de normalidade de “Kolmogorov-Smirnov” e de homogeneidade de “Levine”, para verificar se os resultados assumiam uma distribuição Gaussiana. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste de ANOVA seguido do pós- teste de Tukey, os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. Os resultados foram representados em gráficos de barras demonstrando a média do erro padrão e considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A concentração proteica da saliva dos diferentes triatomíneos foi determinada pelo método de Bradford e foram obtidas as seguintes concentrações médias: 26 mg/ml para *P. herreri*, 29 mg/ml para *M. pallidipennis*, 25 mg/ml para *T. lecticularia* e 20 mg/ml para *R. prolixus*. Considerando o menor e o maior valor encontrado, as amostras variaram de 20 a 29 mg de proteína por ml. Considerando que 10 µl de amostra correspondiam à saliva coletada a partir de três insetos, então estima-se que as glândulas salivares de cada inseto tem aproximadamente de 66 a 100 µg de proteína.

Tabela 1 – Concentração média proteica da saliva de triatomíneos

Espécie	Concentração proteica (mg/ml)
<i>P. herreri</i>	26
<i>M. pallidipennis</i>	29
<i>T. lecticularia</i>	25
<i>R. prolixus</i>	20

6.2 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

Com o objetivo de demonstrar uma possível diferença entre o perfil proteico de proteínas da saliva das diferentes espécies de triatomíneos, uma eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita, e em sequência um ferograma foi construído (Fig. 3). Levando-se em consideração a concentração proteica de cada saliva mensurada pelo método de Bradford, a quantidade de proteína aplicada no gel variou de 20 µg a 29 µg em 1µl.

O perfil proteico observado variou consideravelmente entre as diferentes espécies, sendo observadas, independente da espécie, bandas não inferiores ou superiores a 15,2 a 72,8 kDa, respectivamente. Na saliva de *R. prolixus* a faixa de maior concentração de proteínas foi observada entre 23 e 15 KDa, com destaque para duas bandas mais expressivas com cerca de 23 e 20 kDa, peso referente a maioria das nitroforinas. A espécie *M. pallidipennis* possui proteínas com peso variando aproximadamente de 15 KDa a 39 KDa, sendo que na faixa dos 15 a 23 kDa foram observadas quatro bandas distintas com menor quantidade de proteínas em

relação ao *R. prolixus*. Na saliva de *T. lecticularia* a grande maioria das proteínas possui baixo peso molecular, com destaque para uma banda de maior intensidade na faixa de 15 KDa. Entre as quatro espécies, *P. herreri* apresentou proteínas com a maior variação de pesos moleculares, de 15 a 72 kDa, tendo também uma concentração de proteínas na faixa dos 20 KDa.

Uma banda de baixa ou grande intensidade em determinada faixa de peso molecular pode compreender um conjunto de proteínas distintas, que poderiam ser distinguidas com a realização de uma eletroforese bidimensional. Apesar da não realização de uma eletroforese bidimensional, podemos concluir que os resultados aqui mostrados (números à esquerda no fenograma indicam as diferenças no perfil eletroforético entre as salivas dos diferentes triatomíneos) são suficientes para demonstrar que existe diferença na constituição proteica da saliva entre as espécies. E que a espécie *P. herreri* é a que apresenta as maiores diferenças.

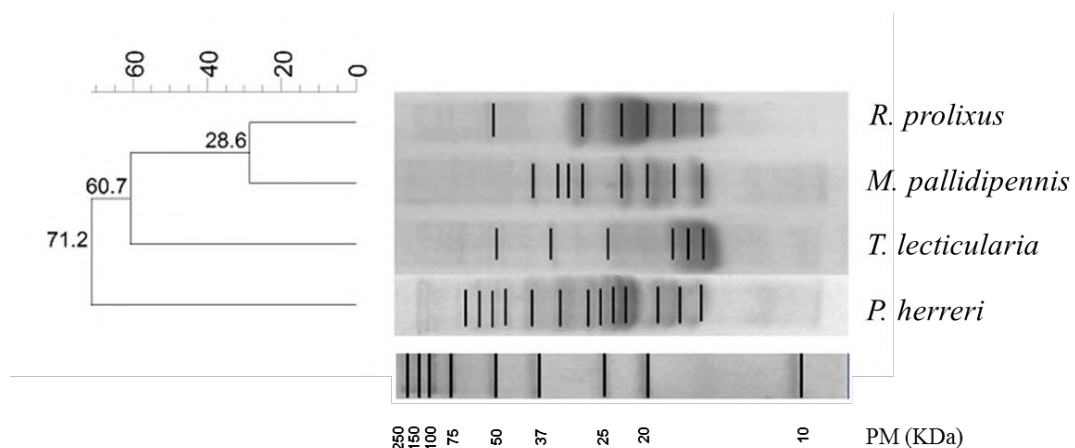


Figura 3. Fenograma obtido a partir do perfil eletroforético de proteínas salivares de triatomíneos. 1µL de saliva dos diferentes triatomíneos foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%. O gel foi corado com o corante azul de Coomassie. Os números, à esquerda, indicam as diferenças entre os isolados. O software GelComparII, versão 5.0, foi utilizado para inferir a diferença entre o perfil proteico dos isolados. Os coeficientes de similaridade foram calculados pelo algoritmo de Dice, e as matrizes geradas foram analisadas por UPGMA, a fim de criar o fenograma. Os números, na parte inferior, correspondem aos pesos moleculares em KDa.

6.3 DIFERENCIAÇÃO DE CD_s

As células da medula óssea de camundongos foram avaliadas durante a diferenciação em CD_s, nos dias 0, 4 e 7 de cultura. Houve um aumento no número de células, partindo do dia 0 com aproximadamente 2×10^6 células por placa até no sétimo dia com um aumento de 5 a 7 vezes (Fig. 4 A-C). Além disso, ao se avaliar a expressão de CD11b e CD11c, observou-se

um aumento considerável na quantidade de células duplo positivas ao longo dos sete dias (Fig. 5 A). Para esta avaliação, primeiramente a população de CDs foi selecionada quanto ao perfil de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) (Fig. 5 C, E e G). Após a seleção da população, as CDs foram avaliadas quanto a expressão das moléculas CD11c e CD11b (Fig. 5 D, F e H). Durante o processo de diferenciação as células sofreram mudanças em sua morfologia chegando ao sétimo dia com um tamanho maior e com uma maior granulosidade (Fig. 5 G). No dia 0, apenas uma minoria das células era duplo positiva CD11b⁺ CD11c⁺ (4,69%), no dia 4, a população duplo positiva aumentou para 25,8% e no dia 7 para 78,8 % (variando de 67.5% a 85.3% dependendo do experimento) (Fig.5 D, F e H).

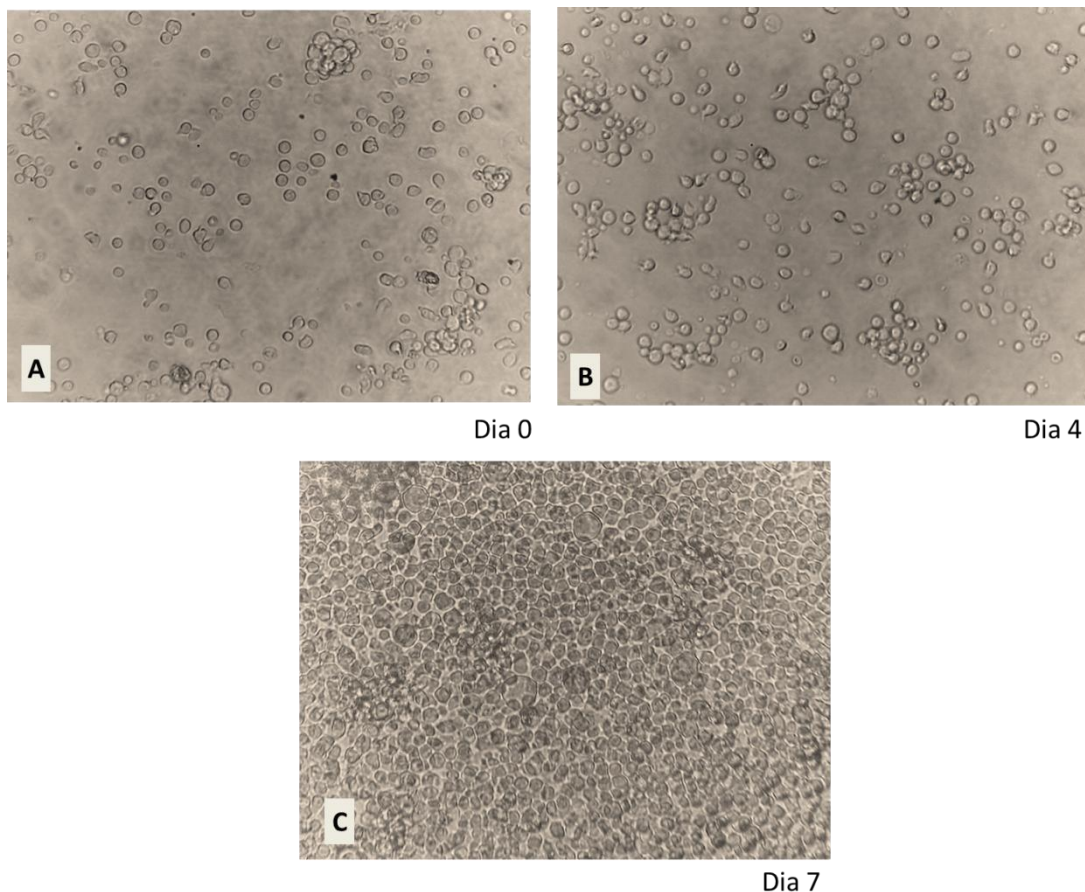


Figura 4. Diferenciação de CDs ao longo dos sete dias de cultura. Células (2×10^6 cél./placa) derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Imagem de microscopia ótica de luz de um campo da placa de cultura, (A) dia 0, (B) dia 4, (C) dia 7. Fonte: arquivo pessoal.

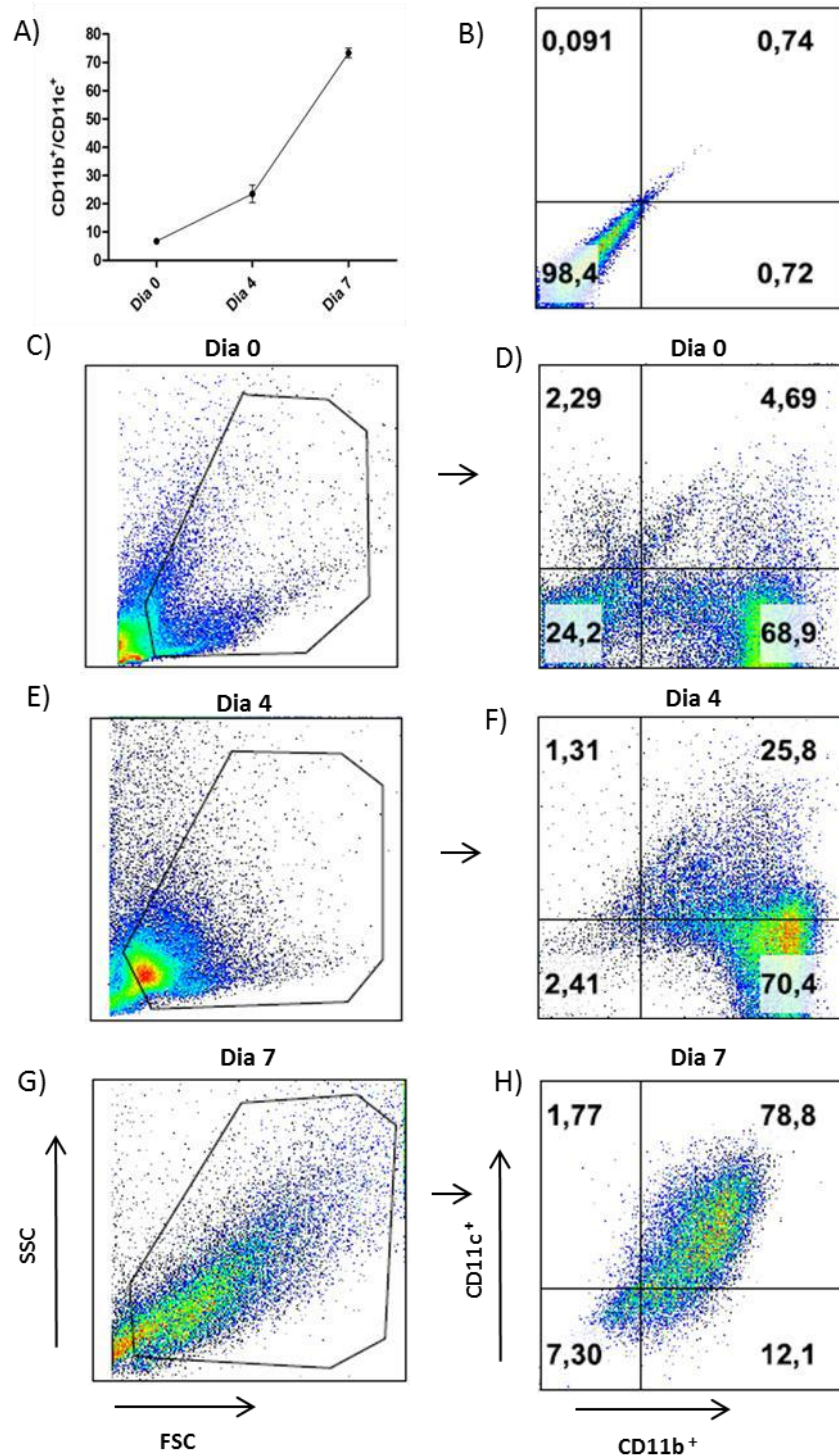


Figura 5. Padronização da diferenciação de CDs. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. As células da cultura foram coletadas e selecionadas primeiramente quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) e em sequência foram avaliadas quanto a expressão das moléculas de superfície CD11b e CD11c nos dias 0 (C-D), 4 (E-F) e 7 (G-H). (A) representação gráfica da evolução da diferenciação de CDs durante os sete dias de cultura. (B) controle não marcado. Figura representativa de todos os experimentos.

6.4 EFEITO DA SALIVA NA DIFERENCIAÇÃO DE CDs

A saliva de todos os triatomíneos avaliados inibiu significativamente ($p < 0,05$) a diferenciação das CDs (Fig. 6). Em todos os casos, a inibição da diferenciação foi dose-dependente, exceto na espécie *T. lecticularia*, em que apenas as diluições 1:30 e 1:100 apresentaram efeito (Fig. 6). Ao comparar-se a quantidade de CDs diferenciadas na ausência de saliva (porcentagem CD11b⁺/CD11c⁺ variando de 67,5 à 78,8) com a menor diluição utilizada (1:30) obteve-se uma redução média de CDs de aproximadamente 79% para a espécie *P. herreri*, 57% para *M. pallidipennis*, 38% para *T. lecticularia* e 76% para *R. prolixus*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (Fig. 6).

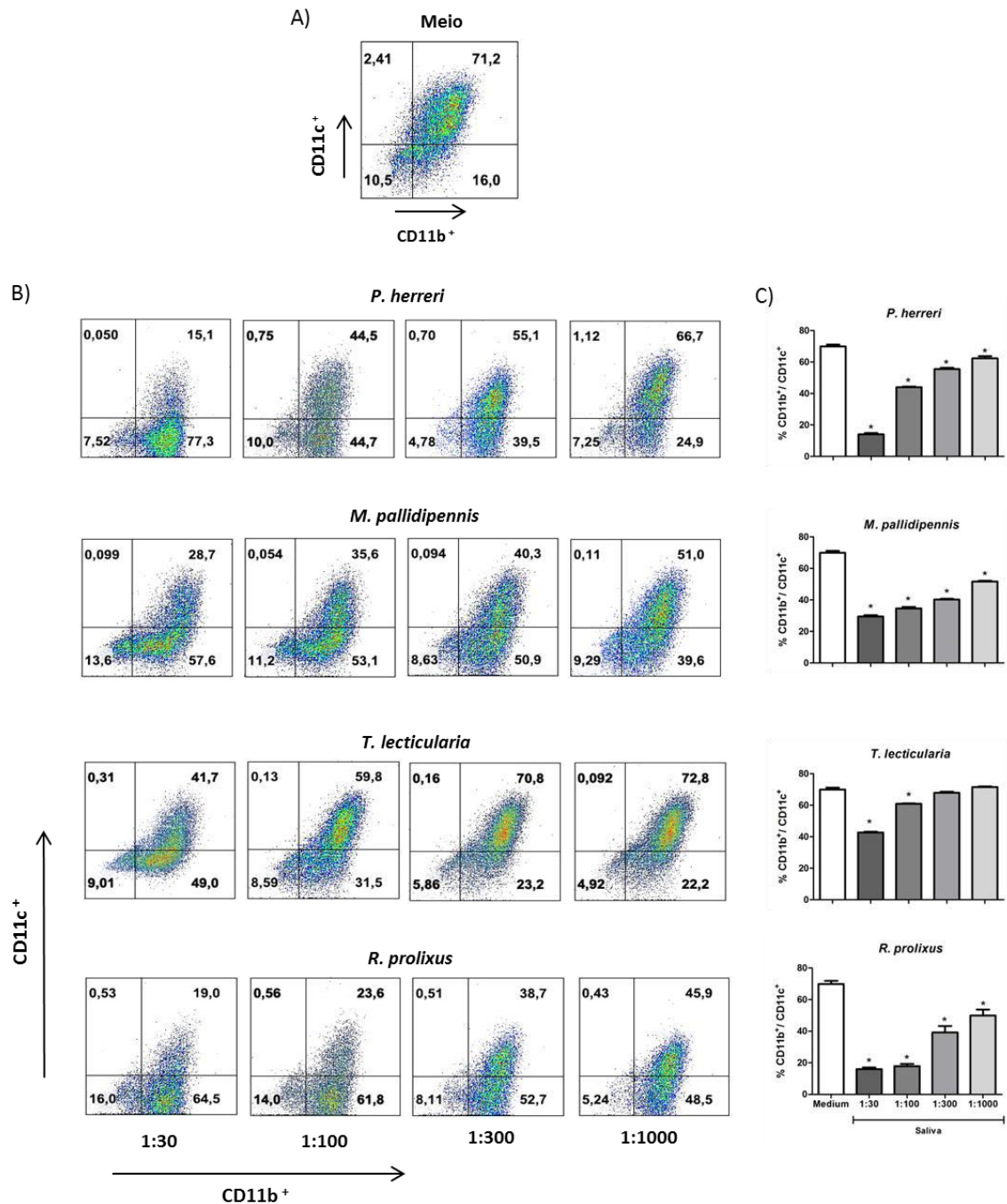


Figura 6. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a diferenciação de CDs. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias, na presença ou não de saliva, *P. herreri*, *M. pallidipennis*, *T. lecticularia* e *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio). As células da cultura foram coletadas e avaliadas para a expressão das moléculas de superfície CD11b⁺/CD11c⁺ no sétimo dia (B) e comparadas com células cultivadas somente com meio de cultura (A). (C) representação gráfica da diferenciação. As barras representam a média ± SEM de triplicatas. *: p < 0,05 comparado com CDs cultivadas somente com meio. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

6.5 EFEITO DA SALIVA SOBRE A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ESTIMULADORAS E CO-ESTIMULADORAS EM CD_s DIFERENCIADAS NA PRESENÇA DE SALIVA

Além de avaliar a capacidade de inibir a diferenciação de CD_s, o perfil das moléculas estimuladoras e co-estimuladoras (MHC-II, CD40 e CD86) nessas CD_s diferenciadas na presença de saliva também foi avaliado. Em relação à molécula MHC-II, com exceção da espécie *M. pallidipennis*, todas as demais espécies foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) a expressão dessa molécula na diluição de 1:30, tendo porcentagem média de inibição de aproximadamente 46% para *P. herreri*, 57% para *T. lecticularia* e de 70% para *R. prolixus* (Fig. 7). A expressão da molécula co-estimuladora CD40 foi inibida significativamente ($p < 0,05$) pelas espécies *P. herreri*, *T. lecticularia* e *M. pallidipennis*, com valores médios de inibição de 44%, 55% e 39%, respectivamente, para a menor diluição utilizada (Fig. 8 A, B e C). A saliva de *M. pallidipennis* também apresentou efeito na diluição de 1:100 com valor médio de inibição de 35% (Fig. 8 C). A saliva de *R. prolixus* foi a única capaz de exercer efeito inibitório sobre a expressão da molécula co-estimuladora CD86, com valor médio de inibição de 80% (Fig. 9 D).

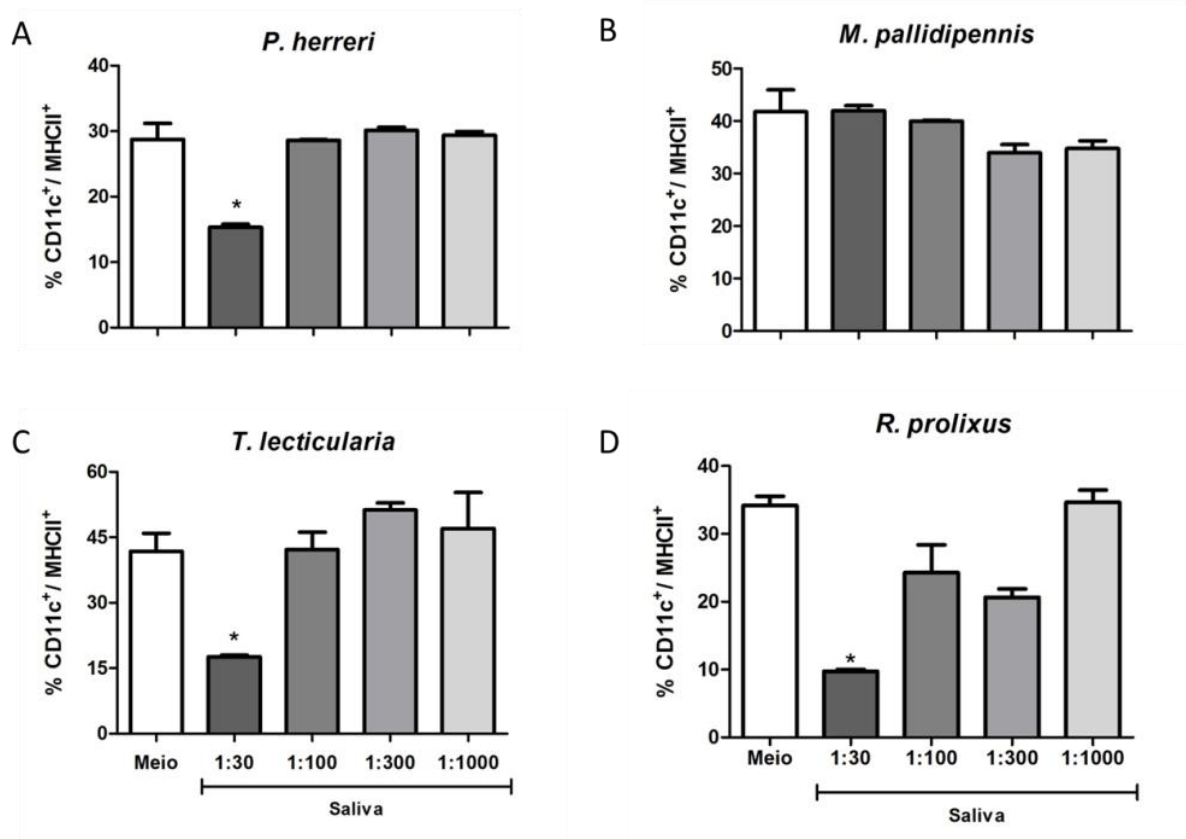


Figura 7. A saliva dos triatomíneos das espécies *P. herreri*, *T. lecticularia* e *R. prolixus* inibem a expressão da molécula de superfície MHC II em CDs diferenciadas na presença de saliva. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias, na presença ou não de saliva, (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio). No sétimo, dia as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície MHC-II. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas somente com meio. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

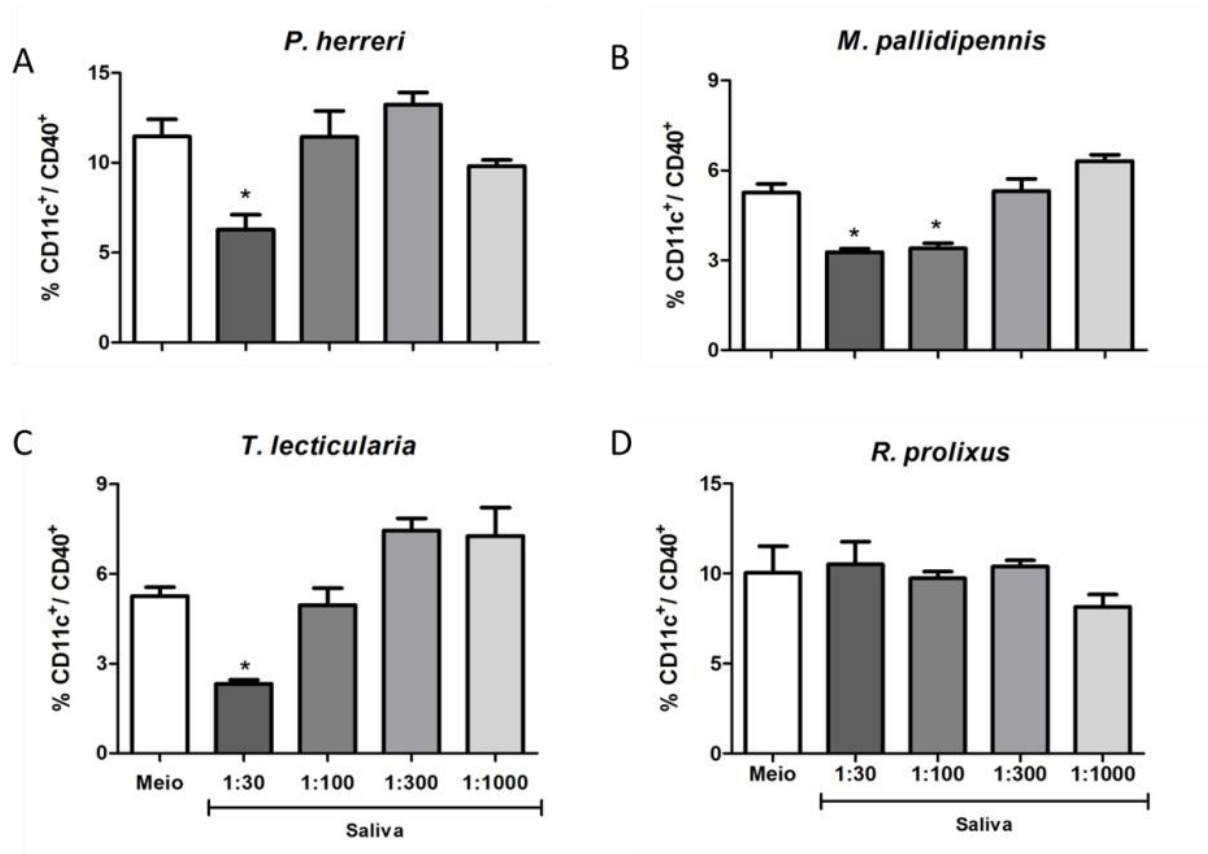


Figura 8. A saliva dos triatomíneos das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* inibe a expressão da molécula de superfície CD40 em CDs diferenciadas na presença de saliva. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias, na presença ou não de saliva, (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio). No sétimo, dia as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície CD40. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas somente com meio. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

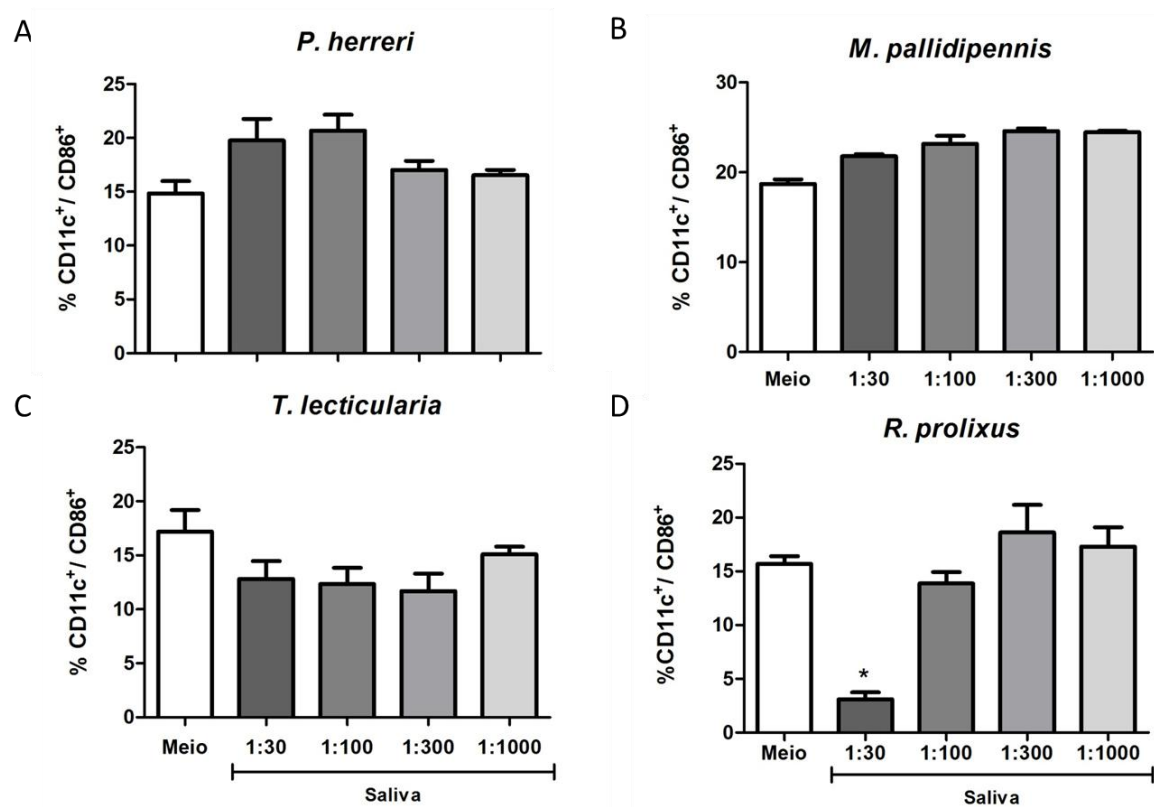


Figura 9. Efeito da saliva de diferentes triatomíneos na expressão da molécula de superfície CD86 em CDs diferenciadas na presença de saliva. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias, na presença ou não de saliva, (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio). No sétimo, dia as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície CD86. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparadas com CDs cultivadas com meio, na ausência de saliva. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

6.6 EFEITO DA SALIVA NA EXPRESSÃO DE CD11c e CD11b EM CDs JÁ DIFERENCIADAS

Depois de observar o efeito inibitório da saliva na diferenciação de CDs e baseado na ideia de plasticidade celular, onde as células tem a capacidade de mudar seus fenótipos, foi avaliado o efeito da saliva na expressão de moléculas características das CDs já diferenciadas. A saliva dos diferentes triatomíneos foi adicionada às CDs já no sétimo dia de diferenciação e, após 18 horas foram analisadas para a expressão de CD11c e CD11b. A saliva dos triatomíneos não alterou a expressão das moléculas CD11c e CD11b em CDs já diferenciadas (Fig. 10). As CDs incubadas na ausência de saliva apresentaram uma população duplo positiva média de 78,35 % e as CDs incubadas com saliva por 18 horas apresentaram valores médios similares, *P. herreri* com 76,3%, *M. pallidipennis* com 71,2%, *T. lecticularia* com 80,0% e *R. prolixus* com 79,1% (Fig. 10).

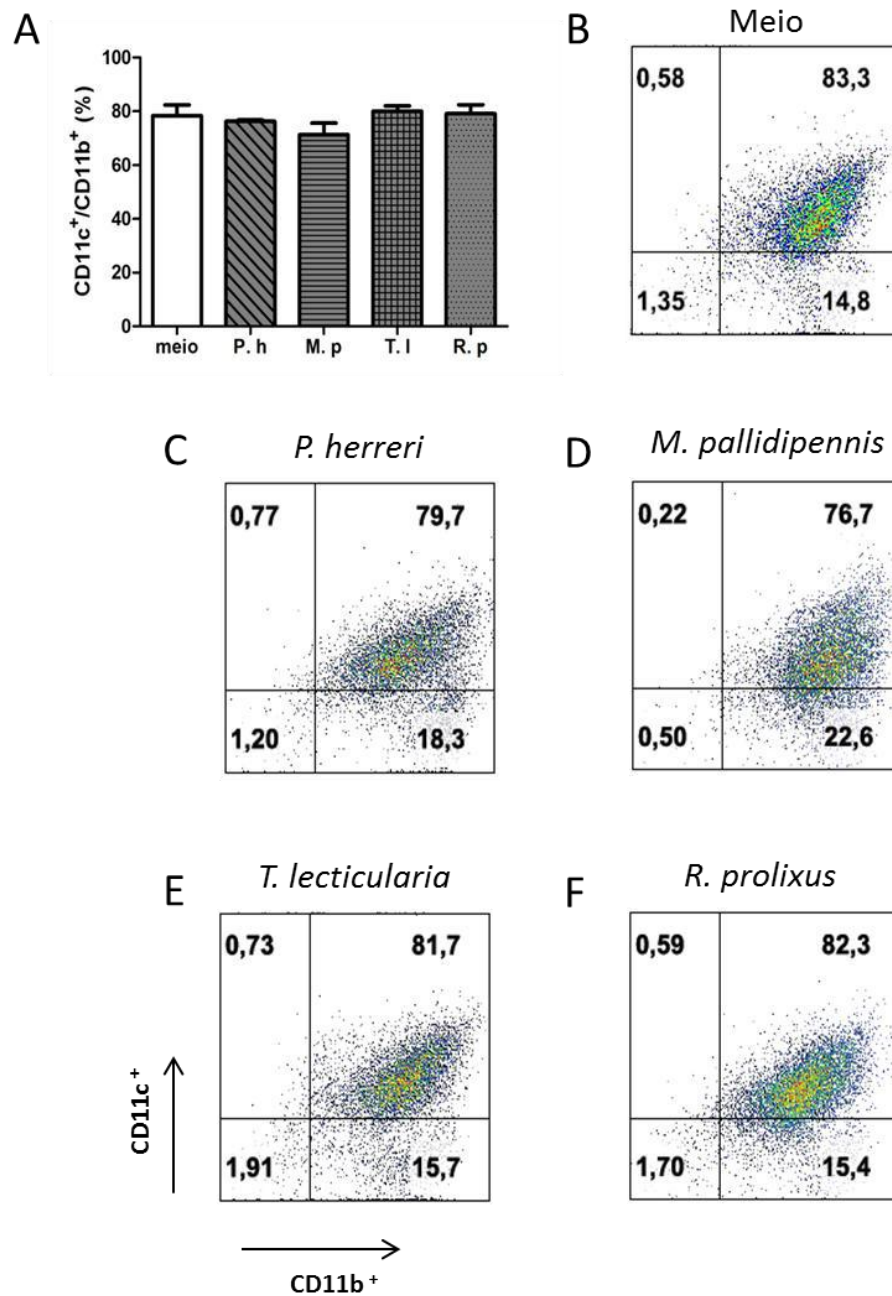


Figura 10. A saliva dos triatomíneos estudados não altera a expressão de CD11c e CD11b em de CDs já diferenciadas. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. No sétimo dia, as CDs já diferenciadas foram incubadas por 18 horas com a saliva dos triatomíneos *P. herreri*, *M. pallidipennis*, *T. lecticularia* e *R. prolixus* (diluição 1:30, v/v). Após esse, tempo as células foram avaliadas quanto a expressão das moléculas de superfície CD11b⁺/CD11c⁺. (A) Percentual de CD11b⁺ CD11c⁺. As barras representam a média ± SEM de triplicatas (B) Células cultivadas com meio, (C) *P. herreri*, (D) *M. pallidipennis*, (E) *T. lecticularia* e (F) *R. prolixus*.

6.7 EFEITO DA SALIVA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CDs ESTIMULADAS COM LPS

Durante o processo de maturação, uma das funções das CDs é a produção de citocinas, importantes para a ativação de linfócitos T e consequente montagem de uma resposta imune adaptativa eficiente. Com o intuito de avaliar o efeito da saliva nesta etapa do processo de maturação, CDs, no sétimo dia de cultura, foram incubadas com saliva das diferentes espécies em diferentes concentrações e estimuladas com LPS (100ng/ml), ligante de TLR-4. Após 18 horas de incubação o sobrenadante das culturas foi coletado e utilizado para a dosagem das citocinas, TNF- α , IL-6, IL-12p40 e IL-10, por ELISA.

A saliva de todos os triatomíneos avaliados mostrou-se capaz de inibir de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de TNF- α em CDs estimuladas com LPS (Fig. 11). A saliva de *P. herreri* e de *M. pallidipennis* inibiu a produção em todas as diluições utilizadas, sendo que nas diluições de 1:30, 1:100 e para 1:300 essa inibição foi maior que 95%, aproximando dos níveis produzidos pelas células sem estimulação, e na diluição de 1:1000 essa inibição foi maior que 50% (Fig. 11 A e B). A espécie *T. lecticularia* inibiu a produção de TNF- α até a diluição de 1:300, com valores de inibição maiores que 80 % e a espécie *R. prolixus* foi capaz de inibir aproximadamente 67% dessa produção mas apenas na menor diluição utilizada (1:30)(Fig. 11 C e D).

A citocina IL-6 teve sua produção inibida de forma significativa ($p < 0,05$) pela saliva dos triatomíneos das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* (Fig. 12 B-D). Um fato interessante observado e compartilhado com as espécies *P. herreri* e *M. pallidipennis* foi o maior nível de inibição na diluição de 1:100 e não com a menor diluição utilizada, 1:30, como aconteceu com *T. lecticularia*. Já a espécie *R. prolixus* apresentou um efeito contrário, estimulando a produção da citocina IL-6 (1:100 e 1:300) (Fig. 12 A).

A produção da citocina IL-12p40 foi significativamente inibida ($p < 0,05$) por todas as espécies avaliadas (Fig. 13). A saliva das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* exerceu forte papel inibitório sobre a produção de IL-12 em todas as diluições utilizadas, tendo porcentagens médias de inibição maiores que 80% nas três menores diluições utilizadas (1:30; 1:100 e 1:300) (Fig. 13 A, B e C). A espécie *R. prolixus* foi capaz de inibir sua produção de forma significativa ($p < 0,05$) apenas na menor diluição (1:30), com porcentagem média de inibição de aproximadamente 66% (Fig. 13 D).

A IL-10 é uma citocina reguladora que está relacionada com a instalação de um ambiente anti-inflamatório. A saliva de todas as espécies avaliadas foi capaz de aumentar de

forma significativa ($p < 0,05$) sua produção (Fig. 14). A saliva de *M. pallidipennis* e *R. prolixus* aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) apenas na menor diluição utilizada, com um aumento aproximado de 3 e 4 vezes, respectivamente (Fig. 14 B e D). A espécie *T. lecticularia* foi capaz de estimular a produção de IL-10 até a diluição de 1:100, sendo que na menor diluição utilizada, esse aumento foi de cerca de 5 vezes (Fig. 14 C). A espécie *P. herreri* estimulou a produção de IL-10 em todas as concentrações utilizadas, tendo na menor diluição utilizada um aumento de cerca de 25 vezes (Fig. 14 A).

Além de avaliar o efeito da saliva sobre CDs estimuladas com LPS, buscou-se também avaliar se a saliva seria capaz de, *per se*, modular a produção dessas citocinas em CDs imaturas, sem estimulação com LPS. A citocina IL-6 teve sua produção aumentada de forma significativa ($p < 0,05$) na menor diluição utilizada (1:30) por três das quatro espécies avaliadas (exceto *T. lecticularia*) (Fig. 15 A). Em relação à citocina IL-12 observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) em sua produção com as espécies *P. herreri* e *R. prolixus* na menor diluição utilizada (1:30), porém muito inferior ao produzido pelas células estimuladas com LPS (Fig. 15 B). A saliva de todas as espécies foi capaz de estimular de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de IL-10 na ausência de LPS em todas as diluições utilizadas (1:30 e 1:300) (Fig. 15 C). Em relação à citocina TNF- α nenhuma das espécies avaliadas causou alteração significativa em sua produção (dados não mostrados).

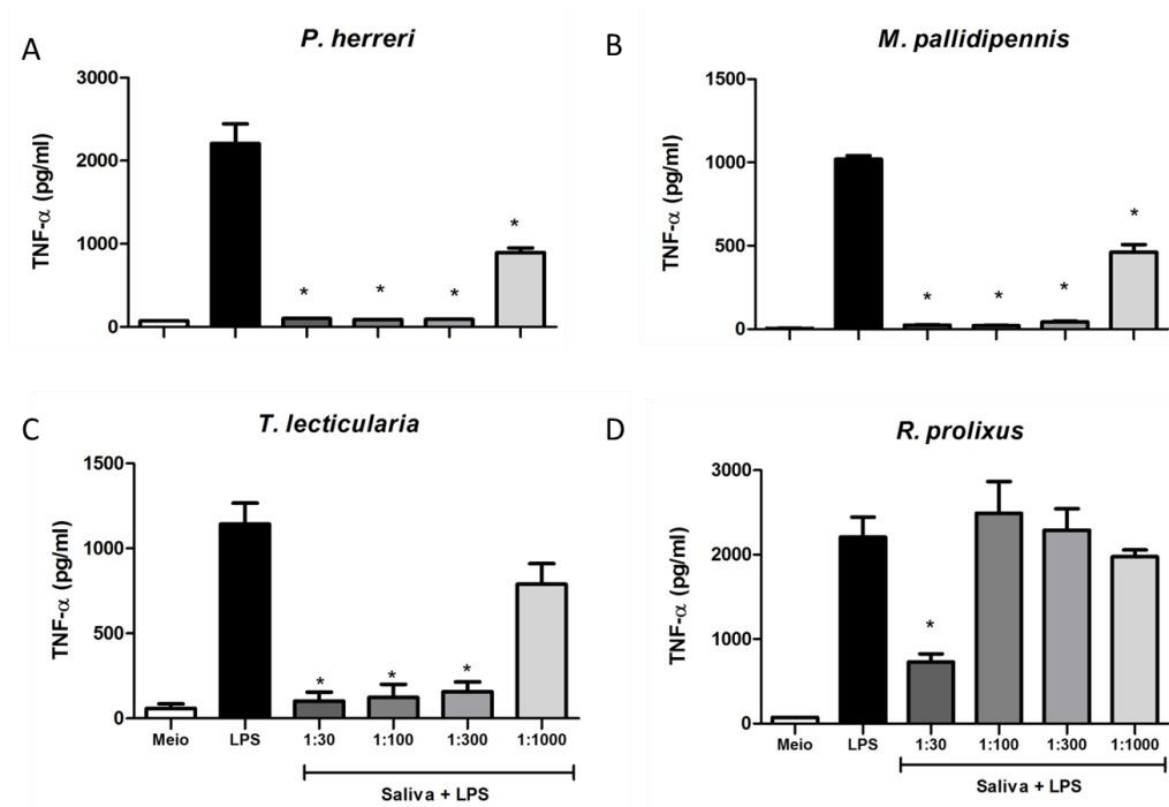


Figura 11. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a produção de TNF- α em CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, o sobrenadante da cultura foi coletado e analisado para detecção de TNF- α . As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com LPS. (Teste ANOVA, pós teste de Tuckey). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

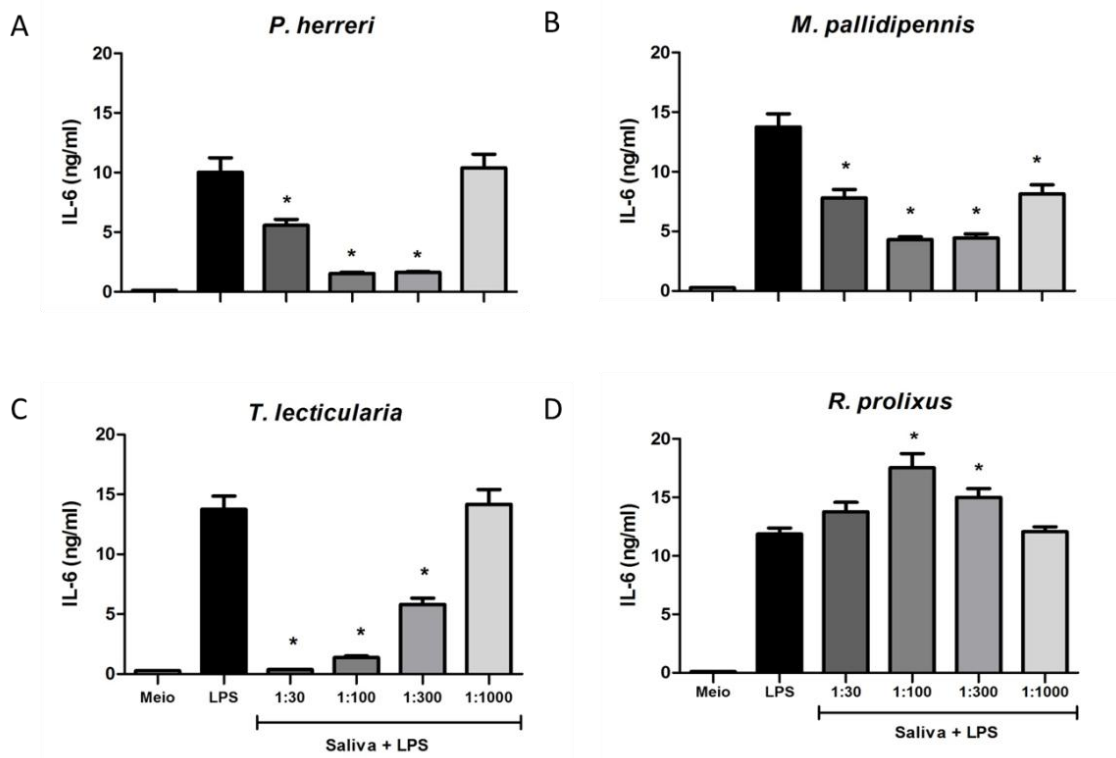


Figura 12. A saliva dos triatomíneos avaliados modula a produção de IL-6 em CD4⁺ estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, o sobrenadante da cultura foi coletado e analisado para detecção de IL-6. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CD4⁺ cultivadas com LPS. (Teste ANOVA, pós teste de Tuckey). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

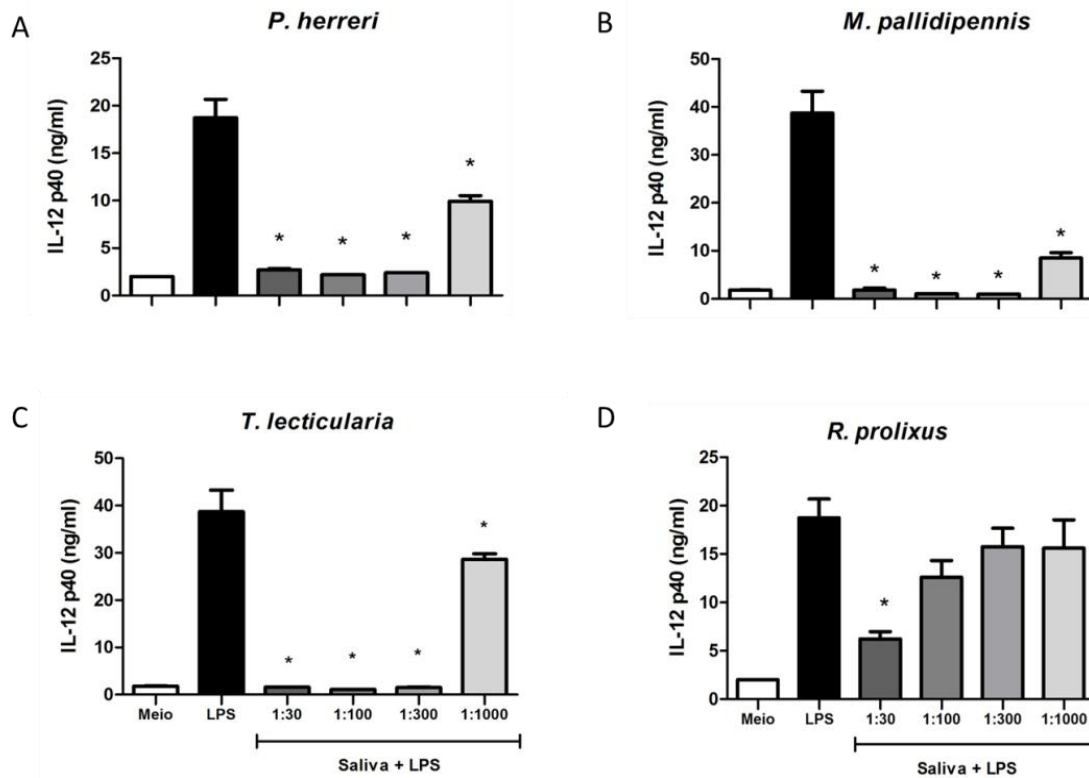


Figura 13. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a produção de IL-12p40 por CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, o sobrenadante da cultura foi coletado e analisado para detecção de IL-12p40. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com LPS. (Teste ANOVA, pós teste de Tuckey). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

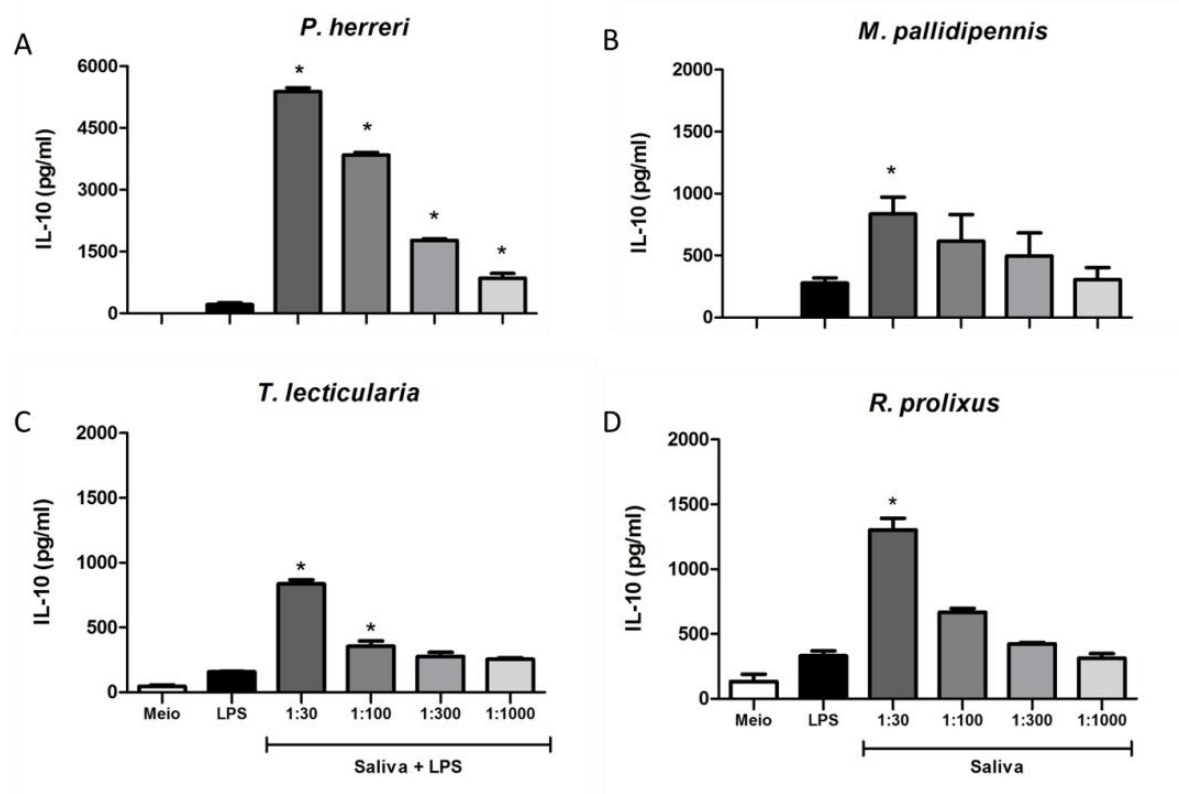


Figura 14. A saliva dos triatomíneos avaliados aumenta a produção de IL-10 em CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. proluxus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi coletado e analisado para detecção de IL-10. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com LPS. (Teste ANOVA, pós teste de Tuckey). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

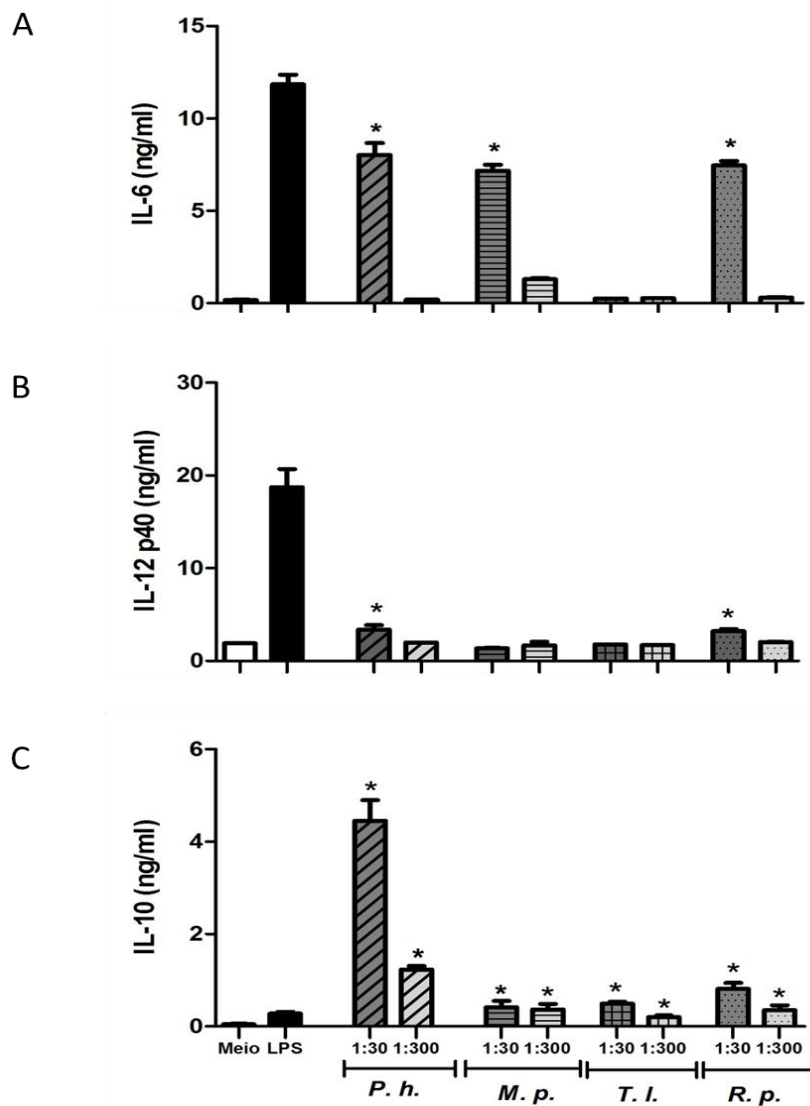


Figura 15. Efeito da saliva de diferentes triatomíneos sobre a produção de citocinas em CDs imaturas. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 18 horas. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi coletado e analisado para detecção de IL-6 (A), IL-12 p40 (B) e IL-10(C). As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas somente com meio. (Teste ANOVA, pós teste de Tuckey). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

6.8 EFEITO DA SALIVA SOBRE A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ESTIMULADORAS E CO-ESTIMULADORAS EM CD_s ESTIMULADAS COM LPS

As CD_s após ativação sofrem mudanças quanto à expressão de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras, como MHC-II, CD40, CD80 e CD86, para realizarem de forma eficiente sua função de apresentação antigênica. A fim de observar se a saliva é capaz de interferir nessa função das CD_s, células estimuladas com LPS e incubadas com saliva foram analisadas quanto à expressão das moléculas MHC-II, CD40, CD80 e CD86.

A expressão da molécula de MHC-II, importante para a apresentação do antígeno propriamente dita, foi inibida significativamente ($p < 0,05$) apenas por uma das quatro espécies avaliadas (Fig. 16). A saliva da espécie *P. herreri* inibiu aproximadamente 33% da expressão da molécula de MCH-II nas células ativadas com LPS, na menor diluição utilizada (1:30) (Fig. 16 A).

As moléculas CD40, CD86 e CD80, importantes como um segundo sinal necessário para ativação de linfócitos T tiveram suas expressões moduladas pela saliva dos diferentes triatomíneos (Fig. 17, 18 e 19). A expressão do CD40 foi inibida em todas as espécies avaliadas, sendo que a saliva dos triatomíneos da espécie *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* foi capaz de agir inclusive nas maiores diluições utilizadas (1:1000), além disso a saliva dessas duas espécies foi capaz de inibir a expressão de CD40 inclusive nas CD_s imaturas, ou seja, na ausência de estimulação por LPS (Fig. 17 B e C). A saliva de *P. herreri* inibiu até a diluição de 1:300 e a de *R. prolixus* até 1:100 (Fig. 17 A e D). A molécula de CD86 teve a expressão inibida de forma significativa ($p < 0,05$), cerca de 38% de inibição, apenas pela saliva de *P. herreri* e na menor diluição utilizada (Fig. 18). O CD80 teve a sua expressão inibida de forma significativa ($p < 0,05$) na presença da saliva das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* (Fig. 19 A-C).

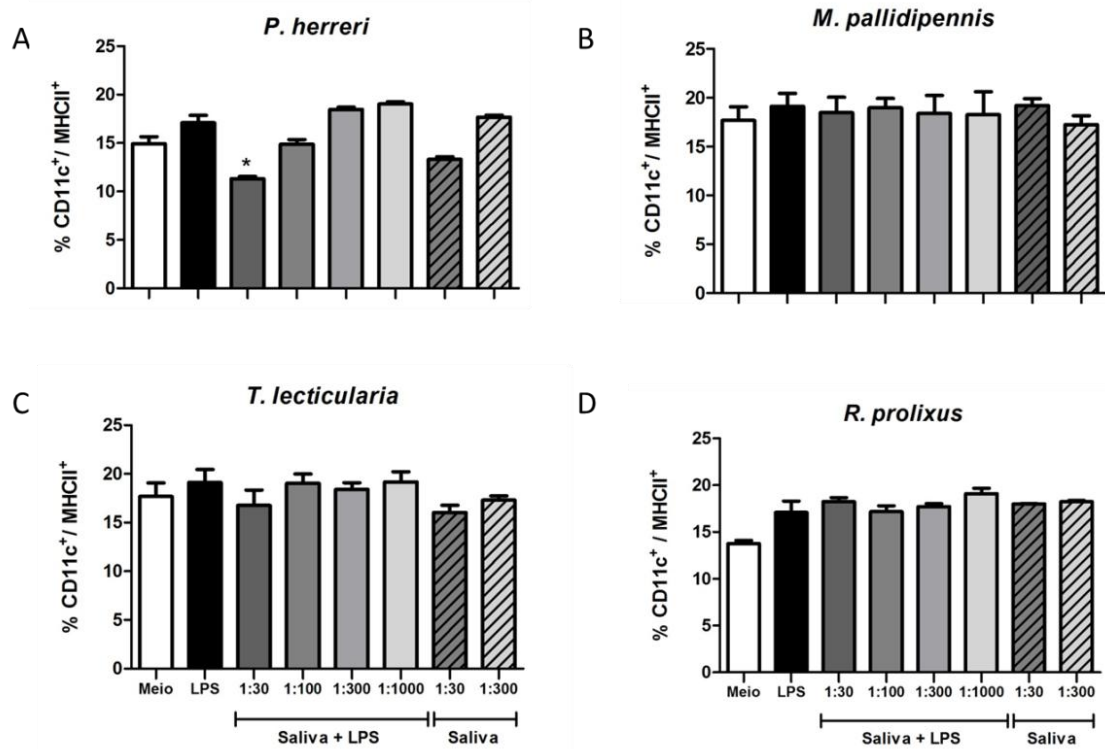


Figura 16. Efeito da saliva de diferentes triatomíneos na expressão da molécula de superfície MHC-II em CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície MHC-II. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

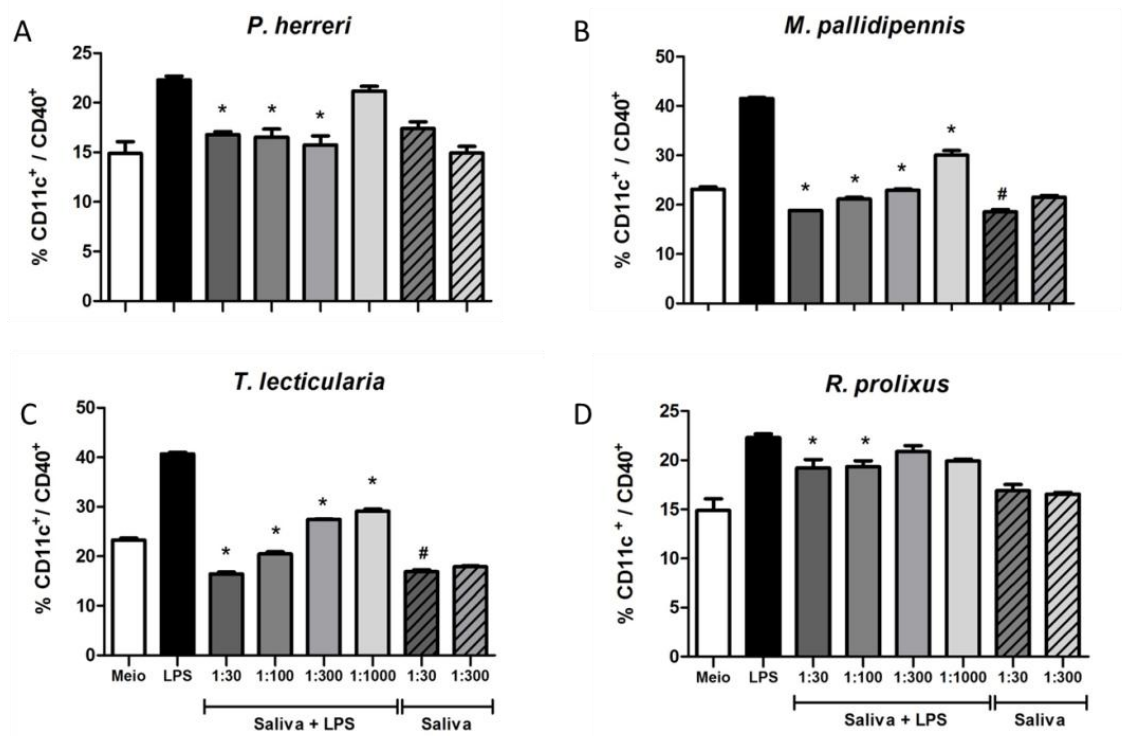


Figura 17. A saliva dos triatomíneos avaliados inibe a expressão da molécula de superfície CD40 em CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície CD40. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com LPS. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

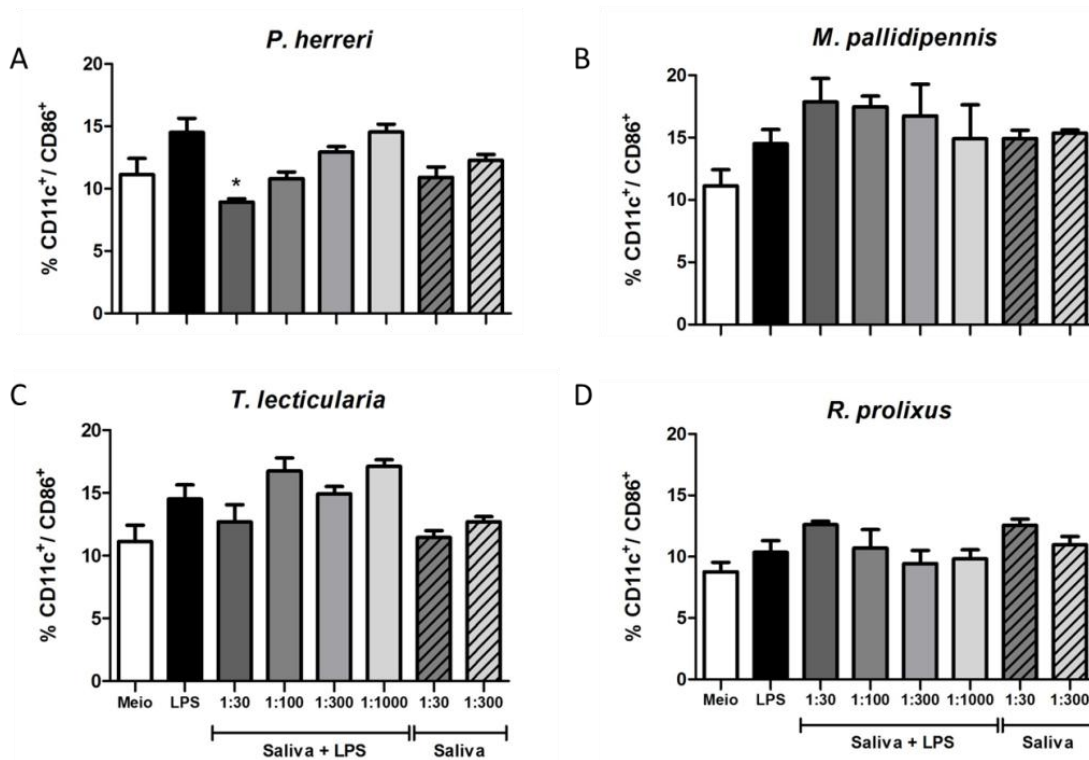


Figura 18. A saliva do triatomíneo *P. herreri* inibe a expressão da molécula de superfície CD86 em CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri*, (B) *M. pallidipennis*, (C) *T. lecticularia* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície CD86. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com LPS. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

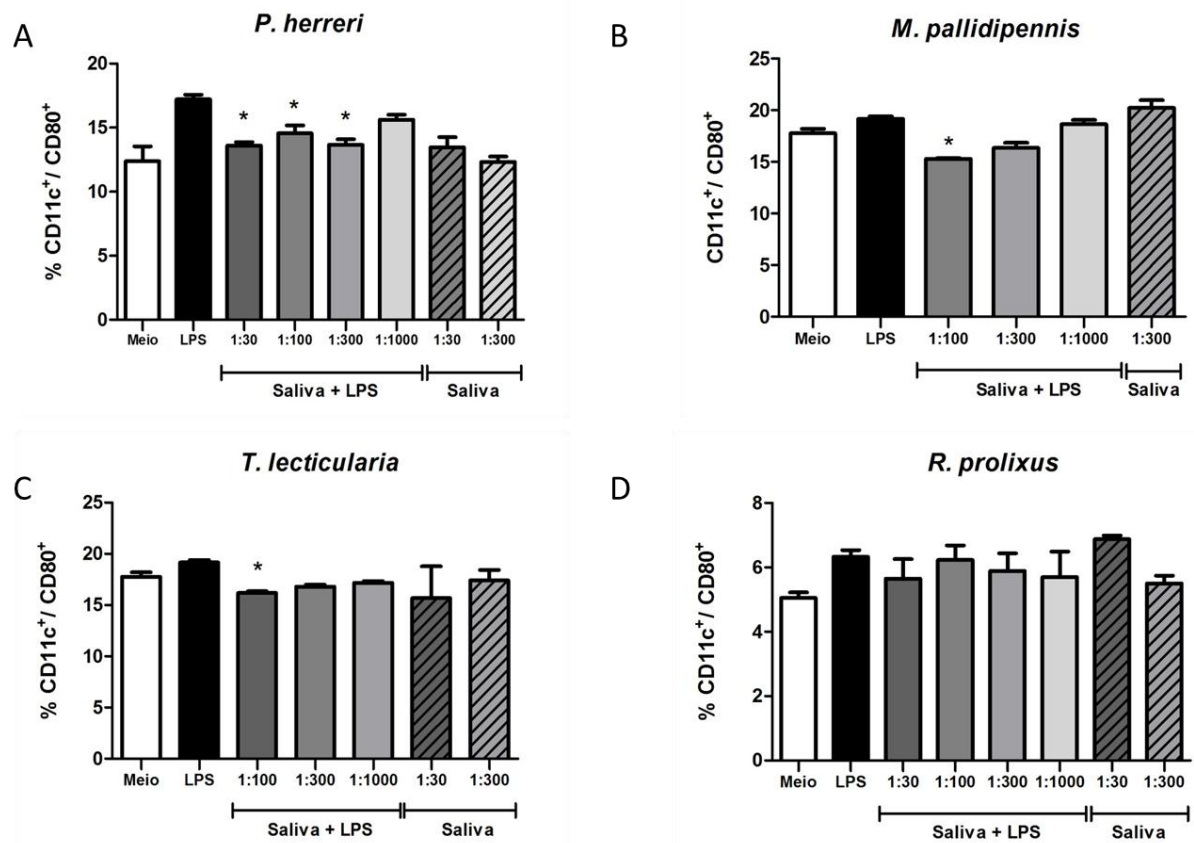


Figura 19. A saliva dos triatomíneos das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis*, e *T. lecticularia* inibe a expressão da molécula de superfície CD80 em CDs estimuladas com LPS. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por 7 dias. Após esse tempo, as células foram pré-incubadas com saliva (A) *P. herreri* e (D) *R. prolixus*, (diluição 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio), (B) *M. pallidipennis* e (D) *T. lecticularia*, (diluição 1:100, 1:300 e 1:1000, v/v em meio) por 1 hora e depois estimuladas por mais 18 horas com LPS (100 ng/mL). Passado esse tempo, as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à expressão da molécula de superfície CD80. As barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com LPS. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

6.9 EFEITO DA SALIVA NA INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CDS

Para avaliar se a saliva dos diferentes triatomíneos altera a viabilidade das células, realizou-se um ensaio de apoptose, em que CDs foram incubadas com a saliva dos diferentes triatomíneos e marcamos com anexina e iodeto de propídeo. Como controle positivo de viabilidade celular utilizamos CDs incubadas somente em meio de cultura, e como controle positivo de apoptose, CDs incubadas por 30 min a 57°C.

A saliva das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* não foi capaz de induzir apoptose nas CDs no tempo (18 horas) e diluição (1:30) utilizado. A única saliva capaz de induzir apoptose (Anexina⁺) de forma significativa ($p < 0,05$) foi a de *R. prolixus*, com uma porcentagem de inibição média de 16% em relação ao controle (Fig. 20).

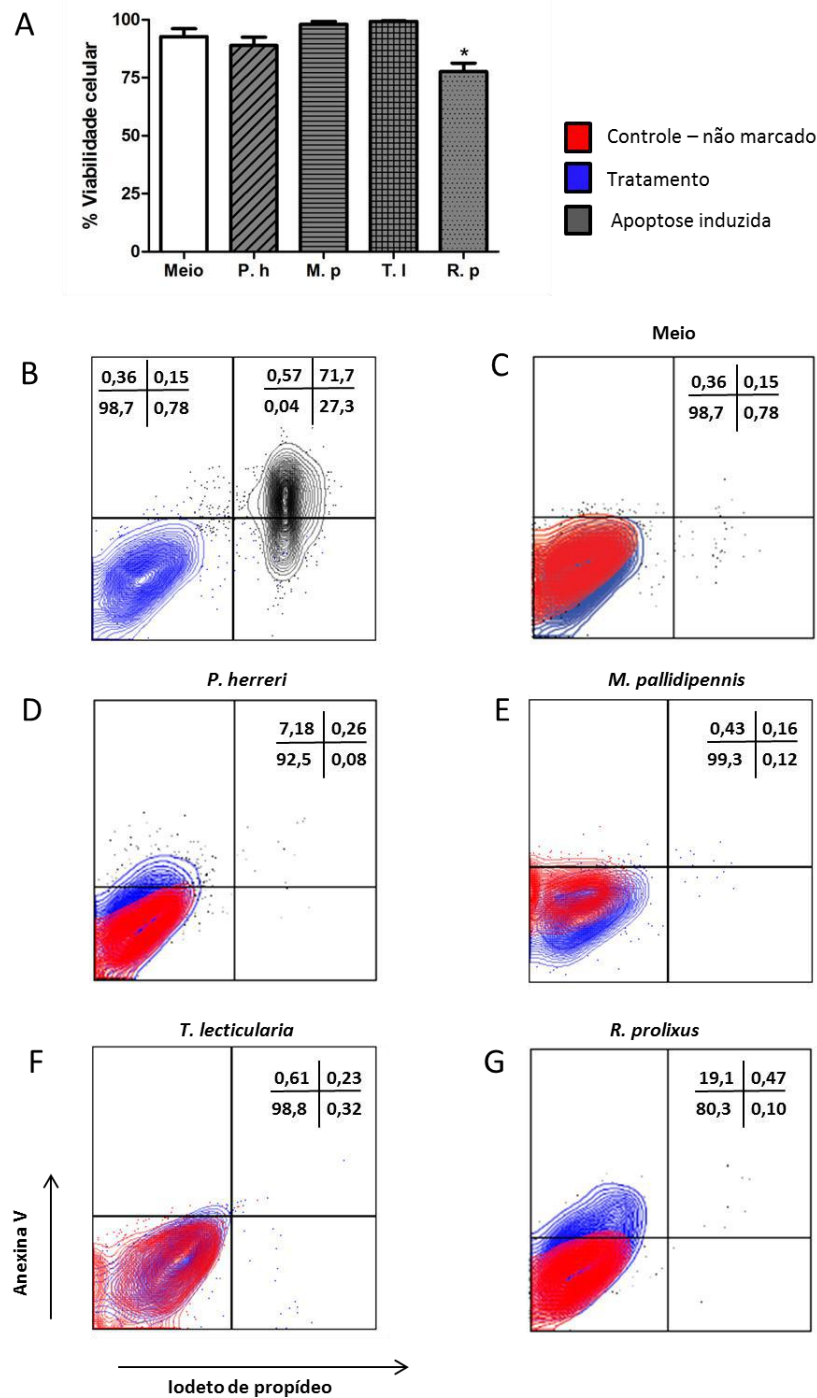


Figura 20. Avaliação do efeito da saliva na indução de apoptose em CDs. Células derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram colhidas e cultivadas na presença de GM-CSF (25 ng/ml) por sete dias. Após esse tempo, as células foram incubadas com ou sem saliva, (C) meio, (D) *P. herreri*, (E) *M. pallidipennis*, (F) *T. lecticularia* e (G) *R. prolixus*, (diluição 1:30, v/v em meio), por 18 horas. Posteriormente, as células da cultura foram coletadas e avaliadas quanto à viabilidade celular. (B) comparação entre controle positivo de viabilidade celular e apoptose induzida por calor. (A) representação gráfica da viabilidade celular, as barras representam a média \pm SEM de triplicatas. *: $p < 0,05$ comparado com CDs cultivadas com meio. (Teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn). As figuras são representativas de dois experimentos independentes.

6.10 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA-E₂ (PGE₂)

Buscando determinar um possível responsável para os efeitos observados e baseado em dados da literatura, que demonstraram relação entre efeitos semelhantes aos descritos e a presença de PGE-2 na saliva de outros artrópodes, buscou-se dosar a presença de PGE₂ na saliva das espécies de triatomíneos (SA-NUNES *et al.*; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Segundo o fabricante, o teste utilizado é capaz de detectar concentrações de até 13,4 pg/mL de PGE₂, contudo as amostras de saliva testadas não apresentaram presença de PGE₂ detectáveis.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a saliva dos triatomíneos inibe a diferenciação e modula a maturação de CDs, sendo que, os efeitos observados são independentes de PGE₂. Esses resultados são muito importantes porque demonstram pela primeira vez que triatomíneos são capazes de modular a biologia de CDs e vem ao encontro de outros achados da literatura que mostram efeitos similares em outros artrópodes hematófagos, com o agravante que os efeitos observados aqui foram encontrados mesmo em altas diluições das salivas. Além disso, esses achados agregam conhecimento do potencial efeito da saliva de triatomíneos, visto que até o presente momento, com raras exceções, apenas estudos sobre atividades anti-hemostáticas da saliva de triatomíneos tinham sido relatadas (FONTAINE *et al.*, 2011; DE ARAUJO *et al.*, 2012).

Foram utilizadas quatro diferentes espécies de triatomíneos pertencentes aos quatro principais gêneros envolvidos na transmissão do *T. cruzi*, sendo que fora do ambiente laboratorial, duas delas tem maior histórico com o habitat peri-doméstico e doméstico (*M. pallidipennis* e *R. prolixus*) e as outras duas mais relacionadas a habitats silvestres (*T. lecticularia* e *P. herreri*). Os efeitos da saliva sobre a biologia de células dendríticas variaram dependendo da espécie de triatomíneo. As diferenças evolutivas e de gêneros podem contribuir para explicar as diferenças em alguns resultados, como os obtidos pela dosagem de proteínas e perfil eletroforético, conforme demonstrado na tabela 1 e figura 3. Durante a evolução, artrópodes hematófagos ao se alimentarem em diferentes hospedeiros foram desafiados por diferentes sistemas de defesa, ou seja, foram submetidos a variadas pressões evolutivas o que pode ter selecionando certas moléculas salivares, resultando assim em uma maior diversidade. Exemplo disso é que dois estudos recentes demonstraram que há grande diferença entre a expressão de genes para proteínas salivares, quando diferentes espécies do gênero *Anopheles* foram submetidas a diferentes pressões seletivas e que essas mudanças aconteceram ao longo dos anos de maneira a selecionar positivamente os vetores mais adaptados (ANDERSEN *et al.*, 2003; ARCA *et al.*, 2014).

No caso específico das diferenças nas concentrações das proteínas salivares vale ressaltar que a espécie *R. prolixus* possui apenas um par de glândulas salivares enquanto as outras três espécies estudadas possuem três pares e esses apresentam composições variadas dependendo do par avaliado (ANHE; LIMA-OLIVEIRA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007). Vale ressaltar também que os efeitos biológicos da saliva demonstrados neste trabalho não apresentam correlação com a concentração proteica e por isso preferimos, após experimentos

pilotos, avaliar apenas em diluições fixas para todas as espécies ao invés de fazer as análises por concentração definida de proteínas.

Em relação à biologia de CDs o primeiro ponto avaliado foi a capacidade da saliva em inibir a sua diferenciação. CDs são diferenciadas a partir de células precursoras da medula óssea e essa diferenciação pode ser mimetizada *in vitro* pela adição dessas células com GM-CSF. Nos nossos experimentos a porcentagem de diferenciação na presença de GM-CSF alcançou valores de 82% e essa dinâmica de diferenciação está de acordo com a literatura (SA-NUNES *et al.*; SA-NUNES *et al.*; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os resultados demonstraram que a saliva das quatro espécies avaliadas inibiu significativamente a diferenciação das CDs. Esses resultados parecem relevantes, uma vez que monócitos recrutados para a pele podem se diferenciar localmente em CDs (CHEONG *et al.*, 2010), assim essa inibição local pela saliva seria de grande importância, por modular o repovoamento celular. Em concordância com os nossos achados, efeito similar foi observado pela ação da saliva do carrapato *Rh. sanguineus* que inibiu cerca de 65% a diferenciação de CDs (CAVASSANI *et al.*, 2005). Tanto nos nossos experimentos como nos experimentos de Cavassani *et al.*, (2005) os efeitos encontrados foram decorrentes da saliva total e portanto sem a caracterização da molécula responsável por esse efeito. Na tentativa de descobrir moléculas com essa atividade, em 2013, foi descrita uma nova proteína derivada do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*, com 17,7 KDa, denominada Japanina, com atividade inibitória na diferenciação de CDs (PRESTON *et al.*, 2013). Apesar de parecer um efeito padrão para todos os artrópodes hematófagos, a capacidade da saliva em inibir a diferenciação de CDs não é comum a todos eles. É sabido que a saliva do mosquito *A. aegypti* não resulta nos mesmos efeitos, ou seja, a saliva não é capaz de inibir a diferenciação das CDs (BIZZARRO *et al.*, 2013).

Além de avaliar o efeito na diferenciação de CDs foi analisado também a expressão das moléculas MHC-II, CD40 e CD86 nestas células diferenciadas na presença da saliva. Assim, além da inibição da diferenciação das CDs, as moléculas MHC-II, CD40 e CD86 também tiveram suas expressões inibidas. A molécula de MHC-II foi inibida pela saliva das espécies *P. herreri*, *T. lecticularia* e *R. prolixus*, a molécula de CD40 foi inibida pela saliva das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia*, e a molécula de CD86 teve sua expressão inibida pela espécie *R. prolixus*. Resultado interessante, pois mesmo as células que se diferenciaram em CDs poderiam ter suas funções prejudicadas durante a apresentação antigênica, ou seja, mesmo conseguindo certo repovoamento celular este não seria eficaz. Resultados um pouco diferentes com a saliva do carrapato *Rh. sanguineus* foram observadas

já que as moléculas MHC-II e CD40 não tiveram suas expressões alteradas e apenas a molécula CD86 teve sua expressão inibida (CAVASSANI *et al.*, 2005).

Uma vez constatado o efeito inibitório da saliva sobre a diferenciação de CDs investigamos também se a saliva tinha a capacidade em alterar os marcadores de diferenciação (CD11c e CD11b) de CDs já diferenciadas. A saliva de nenhuma das quatro espécies avaliadas foi capaz de alterar o fenótipo CD11c⁺/CD11b⁺ das CDs. Ao contrário do observado em nossos estudos é sabido que a saliva do carrapato *R. sanguineus* reverte a população de CDs diferenciadas (CD11c⁺/CD11b⁺) para uma população CD11c⁻/CD11b⁻ e CD11c⁻/CD11b⁺ (CAVASSANI *et al.*, 2005). Assim, podemos deduzir que, diferente do sugerido para carrapatos *Rh. sanguineus* (CAVASSANI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008) durante a inoculação de saliva por triatomíneos, CDs residentes da pele, continuariam como o fenótipo de CDs e que as moléculas da saliva presentes nessas espécies de carrapatos não estão presentes ou estão presentes em baixas concentrações em triatomíneos.

Não somente artrópodes hematófagos exercem efeito inibitório sobre a diferenciação de CDs. É sabido que bactérias comensais podem contribuir para a manutenção da homeostasia intestinal através da modulação da diferenciação de CDs, visto que já foi verificado que algumas bactérias, por inibir MyD88, têm a capacidade de inibir a diferenciação e expressão da molécula MHC-II, desde que elas tenham entrado em contato com as células em estágios iniciais de diferenciação (DAVIES; SHEIL; SHANAHAN, 2009), fenômeno demonstrado em nossos experimentos. Outra explicação seria baseada no fato de que a ativação de receptores TLR pode resultar tanto em estimulação quanto inibição da diferenciação de CDs, dependendo de qual TLR participa dessa interação (BARTZ *et al.*, 2006; SIOUD *et al.*, 2006). A inibição na diferenciação de CDs baseada na interação com TLRs é mediada pela ativação de SOCS-1, inibidor intracelular da via de sinalização JAK/STAT que é ativada pela ação de GM-CSF, resultando assim na perda de sensibilidade ao GM-CSF (BARTZ *et al.*, 2006).

Outra possibilidade para explicar a inibição da diferenciação nos estágios iniciais do processo, seria a ligação de alguma molécula presente na saliva com o GM-CSF adicionado na cultura ou até mesmo a anulação de seu efeito. Estudos prévios com a saliva de carrapatos demonstraram a afinidade de moléculas presentes na saliva frente a algumas citocinas e quimiocinas, bloqueando suas ações (GILLESPIE *et al.*, 2001; HAJNICKA *et al.*, 2001). Futuros estudos serão conduzidos para confirmar ou rejeitar essa hipótese.

Após a captura e processamento dos antígenos, as CDs passam por um processo de maturação necessário para a apresentação antigênica e ativação de linfócitos T. O processo de

maturação engloba uma série de fatores, como aumento na produção de citocinas e expressão de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras. Assim com o objetivo de esclarecer qual o impacto da saliva na maturação das CDs, avaliamos a produção das citocinas TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10 e a expressão das moléculas MHC-II, CD40, CD86 e CD80 de CDs estimuladas com LPS, ligante de TRL4.

A saliva das quatro espécies avaliadas foi capaz de inibir a produção das citocinas TNF- α e IL-12, sendo a saliva das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* àquelas que apresentaram efeito inibitório que alcançou níveis basais de produção. A quarta espécie, *R. prolixus*, que de uma forma geral não apresentou forte inibição, possui saliva constituída principalmente por nitroforinas (CHAMPAGNE; NUSSENZVEIG; RIBEIRO, 1995; MOREIRA *et al.*, 2003; KNIPP *et al.*, 2007) e até o momento nenhuma atividade envolvendo CDs foi atribuída a essas moléculas. Vale ressaltar que a saliva de *R. prolixus* induziu 16 % de apoptose e isso poderia explicar um pouco essa inibição apenas na diluição de 1:30. A citocina IL-6 teve sua produção inibida por *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia* e aumentada por *R. prolixus*. Em relação à citocina IL-10 todas as espécies avaliadas aumentaram sua produção, porém não na mesma intensidade. *P. herreri* aumentou a produção de IL-10 cerca de 20 vezes a mais do que as outras espécies, sugerindo que essa espécie de triatomíneo possa possuir mais moléculas com capacidade de estimular essa produção, ou que possua moléculas mais potentes, lembrando que no resultado obtido pela eletroforese de proteínas (fig. 3) essa espécie foi a que apresentou o maior número de bandas e a que apresentou ter menos similaridade.

Os eventos observados são bastante relevantes, visto que as citocinas IL-12 e TNF- α estão relacionadas com a indução de inflamação e montagem de um perfil de resposta do tipo TH1, ambiente hostil para os vetores e patógenos transmitidos (KAPSENBERG, 2003). A citocina IL-6 dependendo do modelo usado pode estar envolvida tanto com eventos anti-quanto pró-inflamatórios (SCHELLER *et al.*, 2011). Já a citocina IL-10 é bastante conhecida por seus efeitos imunossupressores (BANCHEREAU *et al.*, 2000; LANZAVECCHIA ; SALLUSTO, 2001) e assim como triatomíneos outros artrópodes hematófagos induzem a sua produção. De uma forma geral, a saliva dos triatomíneos avaliados além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias induz a síntese de citocinas anti-inflamatórias.

Além de avaliarmos a produção de citocinas em CDs ativadas com LPS, foi avaliada também a ação direta da saliva em CDs imaturas, na ausência de estimulação com LPS. A saliva das quatro espécies avaliadas não alterou a produção de TNF- α (dados não mostrados). Por outro lado, a citocina IL-6 teve sua produção estimulada pelas espécies *P. herreri*, *M.*

pallidipennis e *R. prolixus* e a produção da IL-12p40 foi aumentada pelas espécies *P. herreri* e *R. prolixus*, nas concentrações mais altas testadas. A citocina IL-10 teve sua produção induzida por todas as espécies avaliadas. A indução da produção das citocinas IL-12p40 e IL-6, na ausência de LPS, pode ser explicada pela ativação de alguma outra via, que não TLR4, visto que a indução de ativação desta via pelo LPS juntamente com a saliva culmina com a inibição de suas produções. Vias diferentes de ativação podem atuar na síntese das mesmas citocinas (HOSHINO *et al.*, 1999; HEMMI *et al.*, 2000). Vale ressaltar que no caso da IL-12, essa indução da produção pela saliva foi muito inferior aquela encontrada quando essas células são estimuladas com LPS.

A influência da saliva em estimular a síntese de IL-10 é bastante relevante visto que vários dos eventos observados podem ser consequência desta produção. A literatura descreve esta citocina inibindo a produção de citocinas pro-inflamatórias, diminuindo a expressão de MHC-II (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991), diminuindo a expressão de CD80 (CHANG; FURUE; TAMAKI, 1995), inibindo a apresentação antigênica (BEISSERT *et al.*, 1995), inibindo a produção de IL-12 (KOCH *et al.*, 1996), e até bloqueando a diferenciação de CDs (BUELENS *et al.*; ALLAVENA *et al.*, 1998; SCHWARZ *et al.*, 2013).

Os mecanismos que esses triatomíneos utilizam para modularem a produção de citocinas ainda não são bem conhecidos e uma das possibilidades para a inibição na produção de algumas citocinas, poderia ser o bloqueio da interação entre LPS e o TLR4. Outra possibilidade seria a interação de alguma molécula salivar com algum fator intracelular, como observado, por exemplo, com o protozoário *Toxoplasma gondii* que modula vias de sinalização intracelular para facilitar sua sobrevivência no hospedeiro (SCHNEIDER *et al.*, 2013). Nesse sentido um bom exemplo que explica essa inibição das vias de sinalização são os carrapatos *R. sanguíneos* que inibem as MAP-kinases ERK-1/2 e p38 que são essenciais para a ativação de várias populações celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstraram que as moléculas MHC-II e CD86 só tiveram suas expressões inibidas por uma das quatro espécies testadas, *P. herreri*. O CD80 teve sua expressão inibida por três das quatro, exceto o *R. prolixus*. E a expressão da molécula de CD40 foi inibida de forma significativa por todas as espécies testadas. A ativação de linfócitos T é dependente de um conjunto de interações, que envolvem a presença das moléculas MHC-II, CD40, CD86 e CD80 com seus respectivos ligantes, na falta de qualquer um dos sinais necessários para a ativação, o processo fica prejudicado, e o linfócito T pode entrar em um estado de anergia celular (SCHWARTZ, 1990). Diante disto, a modulação na expressão dessas moléculas pela saliva juntamente com a redução da produção de citocinas

pró-inflamatórias podem ter grande importância para o sucesso do parasitismo dos triatomíneos.

Concordando com nossos resultados vários outros trabalhos tem demonstrado a saliva de artrópodes tendo efeito inibitório na expressão de moléculas estimuladoras e co-estimuladoras em CDs e na produção de citocinas pro-inflamatórias, o que induziria a um padrão de resposta do tipo TH₂ (FERREIRA; SILVA, 1999; CAVASSANI *et al.*, 2005; SA-NUNES *et al.*, 2007; SKALLOVA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PRESTON *et al.*, 2013).

Outra forma de modulação de CDs é através da indução de apoptose. Mecanismo já descrito sendo utilizado, por exemplo, por alguns organismos como vírus e bactérias (RESCIGNO; BORROW, 2001). Os resultados demonstraram que das quatro espécies de triatomíneos, apenas uma delas, *R. prolixus*, foi capaz de induzir apoptose nas condições testadas. Diante do que já foi discutido a respeito desta espécie sugerimos que talvez parte dos outros efeitos observados, por exemplo, na inibição de algumas citocinas onde o efeito só foi visualizado na menor diluição, seja causado por essa apoptose ou pelo somatório de eventos, inibição e indução de apoptose.

Os efeitos observados – ou parte deles – na modulação de CDs pela saliva *Ixodes scapularis*, como a inibição da produção das citocinas IL-12 e TNF- α e estimulação da produção de IL-10, são causados devido à presença de PGE₂ na saliva (SA-NUNES *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011). PGE₂ é um lipídio com varias atividades de imunomodulação que age em diferentes células da resposta imune. Em CDs, entre outros efeitos, inibe a diferenciação, inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias e estimula a produção de IL-10 (VASSILIOU; JING; GANEA, 2003; SHA; BRUNE; WEIGERT, 2012; AGARD; ASAKRAH ; MORICI, 2013). Em nossos experimentos não foi detectado a presença de PGE₂ na saliva dos triatomíneos, assim os efeitos observados ocorrem independentemente de sua presença.

De uma forma geral os resultados demonstraram que a saliva desses triatomíneos possui moléculas capazes de modular o sistema imune de seus hospedeiros vertebrados, agindo em CDs desde a diferenciação até a maturação, sendo que a saliva da espécie *P. herreri* parece ser constituída das moléculas mais potentes. Além disso, esses resultados esclarecem mais sobre a interação triatomíneo-hospedeiro e fornecem novas perspectivas para o descobrimento de novas moléculas com possíveis usos clínicos, principalmente pela grande especificidade que algumas moléculas oriundas de artrópodes hematófagos possuem.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem concluir que:

- As quatro espécies avaliadas possuem diferentes proteínas salivares;
- A saliva das quatro espécies de triatomíneos inibe a diferenciação de CDs de camundongos;
- CDs diferenciadas na presença de saliva tiveram a expressão das moléculas estimuladoras e co-estimuladoras moduladas pela saliva dos triatomíneos. A expressão de MHC-II foi inibida por *P. herreri*, *T. lecticularia* e *R. prolixus*, a de CD40 inibida por *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia*, e a de CD86 foi inibida apenas por *R. prolixus*;
- A saliva de nenhuma das espécies alterou a expressão das moléculas CD11b e CD11c em CDs já diferenciadas;
- A saliva das quatro espécies testadas inibiu a produção das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-12, e estimulou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em CDs estimuladas com LPS. A produção da citocina IL-6 foi estimulada pela saliva do triatomíneo *R. prolixus* e inibida pela saliva de *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *T. lecticularia*.
- CDs imaturas tiveram a síntese da citocina IL-12 estimulada pela saliva das espécies *P. herreri* e *R. prolixus*, a da IL-6 foi estimulada pela saliva das espécies *P. herreri*, *M. pallidipennis* e *R. prolixus*, e a da IL-10 foi estimulada pelas quatro espécies;
- A expressão das moléculas estimuladoras e co-estimuladoras, em CDs estimuladas com LPS, foi modulada de diferentes maneiras pela saliva dos diferentes triatomíneos, sendo a molécula de CD40 a única inibida por todas as espécies;
- *R. prolixus* foi a única espécie que induziu apoptose de CDs;
- A saliva de nenhuma das quatro espécies de triatomíneos possui PGE₂ em sua constituição.
- De uma forma geral a saliva desses triatomíneos possui moléculas capazes de modular o sistema imune de seus hospedeiros vertebrados, agindo em CDs desde a diferenciação até a maturação, direcionando a resposta imune para um padrão de resposta imunoregulador.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

ADER, D. B. et al. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. **Viral Immunol**, v. 17, n. 2, p. 252-265, 2004.

AGARD, M. et al. PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, n. p. 45, 2013.

AKIRA, S. et al. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

ALEJANDRE-AGUILAR, R. et al. [Comparative study of the susceptibility of 5 triatomine species (Insecta: Reduviidae) to *Trypanosoma cruzi* infection]. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 35, n. 2, p. 201-206, 1993.

ALLAVENA, P. et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 1, p. 359-369, 1998.

ALVARENGA, P. H. et al. The function and three-dimensional structure of a thromboxane A₂/cysteinyl leukotriene-binding protein from the saliva of a mosquito vector of the malaria parasite. **PLoS Biol**, v. 8, n. 11, p. e1000547, 2010.

AMINO, R. et al. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, n. 4-5, p. 465-472, 2001.

ANDERSEN, J. F. et al. Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. **Biochemistry**, v. 39, n. 33, p. 10118-10131, 2000.

ANDERSEN, J. F. et al. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **J Biol Chem**, v. 278, n. 7, p. 4611-4617, 2003.

ANDERSEN, J. F. et al. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 58, n. 2, p. 97-105, 2005.

ANHE, A. C. et al. Acid phosphatase activity distribution in salivary glands of triatomines (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Genet Mol Res**, v. 6, n. 1, p. 197-205, 2007.

ARAUJO, C. A. et al. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 7, p. 547-560, 2006.

ARAUJO, R. N. et al. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 12, p. 1351-1358, 2007.

ARAUJO, R. N. et al. (2011). Electromyogram of the Cibarial Pump and the Feeding Process in Hematophagous Hemiptera. *Advances in Applied Electromyography*. P. J. Mizrahi. [http:// www.intechopen.com/books/advances-in-applied- electromyography/ electromyogram-of-the-cibarial-pump-and-the-feeding-process-in-hematophagous-hemiptera](http://www.intechopen.com/books/advances-in-applied-electromyography/electromyogram-of-the-cibarial-pump-and-the-feeding-process-in-hematophagous-hemiptera).

ARCA, B. et al. Positive selection drives accelerated evolution of mosquito salivary genes associated with blood-feeding. *Insect Mol Biol*, v. 23, n. 1, p. 122-131, 2014.

ARDAVIN, C. et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*, v. 22, n. 12, p. 691-700, 2001.

ASSUMPCAO, T. C. et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 38, n. 2, p. 213-232, 2008.

ASSUMPCAO, T. C. et al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J Proteome Res*, v. 10, n. 2, p. 669-679, 2011.

BANCHEREAU, J. ; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, v. 18, n. p. 767-811, 2000.

BARRETO-SANTANA, D. et al. [Comparative biology and feeding behavior of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius robustus* (Triatominae) under laboratory conditions]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 44, n. 4, p. 490-495, 2011.

BARROS, V. C. et al. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One*, v. 4, n. 6, p. e6047, 2009.

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

BARTZ, H. et al. Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation. *Blood*, v. 108, n. 13, p. 4102-4108, 2006.

BEISSERT, S. et al. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol*, v. 154, n. 3, p. 1280-1286, 1995.

BENÍTEZ-ALVA, J. I. et al. Distribution of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) associated with human habitation and potential risk areas in six states of the Mexican Republic. *BIOCYT*, v. 5, n. 17, p. 327-340, 2012.

BIZZARRO, B. et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasit Vectors**, v. 6, n. p. 329, 2013.

BLUESTONE, J. A. et al. The functional plasticity of T cell subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 11, p. 811-816, 2009.

BONASIO, R. ; VON ANDRIAN, U. H. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 4, p. 503-511, 2006.

BROSSARD, M. ; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. p. S161-176, 2004.

BUELENS, C. et al. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 3, p. 756-762, 1997.

BUSSACOS, A. C. et al. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1693-1700, 2011.

BUSSACOS, A. C. et al. Diversity of anti-haemostatic proteins in the salivary glands of *Rhodnius* species transmitters of Chagas disease in the greater Amazon. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1664-1672, 2011.

CARCAVALLO, R. et al. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): proposal for taxonomic arrangements. **Entomol. Vect.**, v. 7, n. p. 79-81, 2000.

CARREGARO, V. et al. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 1, p. 104-114, 2008.

CARREGARO, V. et al. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. **J Immunol**, v. 187, n. 8, p. 4347-4359, 2011.

CAVALCANTE, R. R. et al. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. **Parasitology**, v. 127, n. Pt 1, p. 87-93, 2003.

CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 235-245, 2005.

CELLA, M. et al. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 10-16, 1997.

CHAMPAGNE, D. E. et al. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 270, n. 15, p. 8691-8695, 1995.

CHANG, C. H. et al. B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon-gamma or by interleukin-10. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 2, p. 394-398, 1995.

CHEONG, C. et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. **Cell**, v. 143, n. 3, p. 416-429, 2010.

COURA, J. R. ; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COUVREUR, B. et al. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1400, 2008.

CUBA, C. A. et al. The triatomines of northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 175-183, 2002.

DAVIES, J. M. et al. Bacterial signalling overrides cytokine signalling and modifies dendritic cell differentiation. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e805-815, 2009.

DE ARAUJO, C. N. et al. Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **J Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3829-3841, 2012.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

DEANE, M. P. E. ; DAMASCENO, R. M. G. Encontro do *Panstrongylus lignarius* naturalmente infectado por tripanosoma do tipo cruzi e algumas notas sôbre sua biologia. **Rev. do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 2, n. 3, p. 809-814 1949.

FAUDRY, E. et al. Kinetics of expression of the salivary apyrases in *Triatoma infestans*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 10, p. 1051-1058, 2004.

FAUDRY, E. et al. Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homo-oligomers. **Biochem J**, v. 396, n. 3, p. 509-515, 2006.

FERREIRA, B. R. ; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434-439, 1999.

FONTAINE, A. et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. **Parasit Vectors**, v. 4, n. p. 187, 2011.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 17, p. 12639-12650, 2000.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, n. p. 2051-2088, 2009.

GALVÃO, C. A sistemática dos triatomíneos (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), de DE GEER ao DNA. **Entomol. Vect.**, v. 10 n. (4), p. 511-530, 2003.

GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **ZOOTAXA**, v. 202, n. p. 1-36, 2003.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Mol Immunol**, v. 41, n. 11, p. 1089-1098, 2004.

GAUNT, M. ; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 557-565, 2000.

GILLESPIE, R. D. et al. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. **J Immunol**, v. 166, n. 7, p. 4319-4326, 2001.

GOLODNE, D. M. et al. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 30, p. 27766-27771, 2003.

GORLA, D. E. et al. Biosystematics of Old World Triatominae. **Acta Trop**, v. 63, n. 2-3, p. 127-140, 1997.

GUARNERI, A. A. et al. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. **Acta Trop**, v. 87, n. 3, p. 361-370, 2003.

GUHL, F. ; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.

GUO, R. F. ; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu Rev Immunol**, v. 23, n. p. 821-852, 2005.

GURGEL-GONCALVES, R. et al. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **J Trop Med**, v. 2012, n. p. 705326, 2012.

GURTLER, R. E. et al. Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. **Int J Epidemiol**, v. 37, n. 4, p. 698-701, 2008.

HAJNICKA, V. et al. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunol**, v. 23, n. 9, p. 483-489, 2001.

HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740-745, 2000.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 3749-3752, 1999.

HUBER-LANG, M. et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. **Nat Med**, v. 12, n. 6, p. 682-687, 2006.

IP, W. K. et al. Mannose-binding lectin and innate immunity. **Immunol Rev**, v. 230, n. 1, p. 9-21, 2009.

ISAWA, H. et al. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. **J Biol Chem**, v. 277, n. 31, p. 27651-27658, 2002.

ISAWA, H. et al. Identification and characterization of a new kallikrein-kinin system inhibitor from the salivary glands of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 5, p. 466-477, 2007.

ISAWA, H. et al. Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*. **FEBS J**, v. 274, n. 16, p. 4271-4286, 2007.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 25, n. p. 381-418, 2007.

JANEWAY, C. A., JR. ; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, n. p. 197-216, 2002.

KAISHO, T. ; AKIRA, S. Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. **Curr Mol Med**, v. 3, n. 8, p. 759-771, 2003.

KALINSKI, P. et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol Today**, v. 20, n. 12, p. 561-567, 1999.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 12, p. 984-993, 2003.

KJOS, S. A. et al. Biogeography and *Trypanosoma cruzi* infection prevalence of Chagas disease vectors in Texas, USA. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 1, p. 41-50, 2009.

KNIPP, M. et al. Spectroscopic and functional characterization of nitrophorin 7 from the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* reveals an important role of its isoform-specific N-terminus for proper protein function. **Biochemistry**, v. 46, n. 46, p. 13254-13268, 2007.

KOCH, F. et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 741-746, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANZAVECCHIA, A. ; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 263-266, 2001.

LAVOPIERRE, M. M. et al. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 53, n. p. 235-250, 1959.

LENT, H. ; WYGODZINSKY, P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bull. Am.Mus. Nat. Hist.** , v. 163, n. p. 123–520, 1979.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 259-262, 2001.

LOPEZ-ORDONEZ, T. et al. [Genomic and proteomic contributions for Chagas disease control]. **Salud Publica Mex**, v. 51 Suppl 3, n. p. S410-423, 2009.

MANS, B. J. et al. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exp Appl Acarol**, v. 22, n. 6, p. 353-366, 1998.

MANS, B. J. et al. Amino acid sequence and structure modeling of savignin, a thrombin inhibitor from the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, n. 7, p. 821-828, 2002.

MANS, B. J. et al. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. **J Biol Chem**, v. 283, n. 27, p. 18721-18733, 2008.

MARCILLA, A. et al. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Genet Evol**, v. 1, n. 3, p. 225-235, 2002.

MARTINEZ-IBARRA, J. A. et al. Biology of three species of North American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on rabbits. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 925-930, 2007.

MARTINEZ-IBARRA, J. A. et al. Bionomics of populations of *Meccus pallidipennis* (Stål), 1872 (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico. **J Vector Ecol**, v. 37, n. 2, p. 474-477, 2012.

MARTINEZ-IBARRA, J. A. et al. Differences on biological attributes of three populations of *Meccus pallidipennis* Stål (Hemiptera: Reduviidae). **J Vector Borne Dis**, v. 51, n. 1, p. 22-26, 2014.

MARTÍNEZ-IBARRA, J. A. ; NOVELO-LÓPEZ, M. Blood meals to molt, feeding time and postfeeding defecation delay of *Meccus pallidipennis* (Stål, 1872) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. **Folia Entomol. Mex.**, v. 43, n. 3, p. 313-319, 2004.

MCHEYZER-WILLIAMS, L. J. ; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Antigen-specific memory B cell development. **Annu Rev Immunol**, v. 23, n. p. 487-513, 2005.

MEIRELLES, R. M. et al. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 35, n. 2, p. 199-207, 2003.

MESQUITA, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect Immun**, v. 76, n. 12, p. 5543-5552, 2008.

MONTFORT, W. R. et al. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. **Biochim Biophys Acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 110-118, 2000.

MOREIRA, M. F. et al. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, n. 1, p. 23-28, 2003.

MORITA, A. et al. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **FEBS J**, v. 273, n. 13, p. 2955-2962, 2006.

NOESKE-JUNGBLUT, C. et al. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J Biol Chem**, v. 270, n. 48, p. 28629-28634, 1995.

OBARA, M. T. et al. [Morphologic, morphometrical, and histological aspects of the eggs of four species of the genera *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 13-19, 2007.

OBARA, M. T. et al. [Morphological and histological study of eggs of six species of the *Triatoma* genus (Hemiptera: Reduviidae)]. **Neotrop Entomol**, v. 36, n. 5, p. 798-806, 2007.

OLIVEIRA, C. J. et al. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 6, p. 705-716, 2008.

OLIVEIRA, C. J. et al. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Vet Parasitol**, v. 167, n. 2-4, p. 288-297, 2010.

OLIVEIRA, C. J. et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **J Biol Chem**, v. 286, n. 13, p. 10960-10969, 2011.

PATTERSON, J. S. et al. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 187-199, 2009.

PAULA, A. M. D. et al. Registro de ocorrência de *Panstrongylus lignarius* (Walker, 1837) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 117 - 119, 2013.

PINHO, A. P. et al. The Occurrence of *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, Naturally Infected by *Trypanosoma cruzi* in the State of Rio de Janeiro, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. p. 141-143, 1998.

PINTO, J. et al. Fuentes de alimentación de *Panstrongylus herreri* (Hemiptera: triatominae) capturados en Utcubamba, Amazonas - Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 25, n. p. 179-184, 2008.

PRESTON, S. G. et al. Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 6, p. e1003450, 2013.

RESCIGNO, M. ; BORROW, P. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 267-270, 2001.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp Biochem Physiol B**, v. 79, n. 1, p. 81-86, 1984.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev Entomol**, v. 32, n. p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J. M. et al. Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. **Comp Biochem Physiol B**, v. 95, n. 2, p. 215-219, 1990.

RIBEIRO, J. M. ; WALKER, F. A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **J Exp Med**, v. 180, n. 6, p. 2251-2257, 1994.

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

RIBEIRO, J. M. et al. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochem J**, v. 308 (Pt 1), n. p. 243-249, 1995.

RIBEIRO, J. M. et al. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 2, p. 111-129, 2006.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1497-1505, 2007.

SA-NUNES, A. et al. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. **J Immunol**, v. 182, n. 12, p. 7422-7429, 2009.

SÁ-NUNES, A. ; OLIVEIRA, C. J. Sialogenins and Immunomodulators Derived from Blood Feeding Parasites. In: Toxins and hemostasis. 2010.

SALLUSTO, F. et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 9, p. 2760-2769, 1998.

SALLUSTO, F. ; LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 611-614, 1999.

SANT'ANNA, M. R. et al. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. **J Insect Physiol**, v. 47, n. 12, p. 1459-1465, 2001.

SARKIS, J. J. et al. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. **Biochem J**, v. 233, n. 3, p. 885-891, 1986.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SCHNEIDER, A. G. et al. *Toxoplasma gondii* triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell STAT1 while simultaneously blocking IFN γ -induced STAT1 transcriptional activity. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60215, 2013.

SCHNEIDER, B. S. et al. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. **Viral Immunol**, v. 17, n. 4, p. 565-573, 2004.

SCHNEIDER, B. S. ; HIGGS, S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 5, p. 400-408, 2008.

SCHOFIELD, C. J. et al. The process of domestication in Triatominae. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, n. p. 375-378, 1999.

SCHOFIELD, C. J. ; GALVAO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

SCHWARTZ, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, v. 248, n. 4961, p. 1349-1356, 1990.

SCHWARZ, A. M. et al. Impact of interleukin-10 on phenotype and gene expression during early monocyte differentiation into dendritic cells. **Anticancer Res**, v. 33, n. 11, p. 4791-4798, 2013.

SHA, W. et al. The multi-faceted roles of prostaglandin E2 in cancer-infiltrating mononuclear phagocyte biology. **Immunobiology**, v. 217, n. 12, p. 1225-1232, 2012.

SHORTMAN, K. ; CAUX, C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. **Stem Cells**, v. 15, n. 6, p. 409-419, 1997.

SHORTMAN, K. ; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 151-161, 2002.

SILVA-NETO, M. A. et al. Lysophosphatidylcholine: A Novel Modulator of *Trypanosoma cruzi* Transmission. **J Parasitol Res**, v. 2012, n. p. 625838, 2012.

SILVA, I. G. ; SILVA, H. H. G. Estudo comparado do ciclo evolutivo de triatomíneos a duas temperaturas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 84, n. p. 499-500, 1989.

SILVA, I. G. et al. Ciclo evolutivo de *Triatoma lecticularia* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). **Rev Patol Trop** v. 22, n. p. 259-263, 1993.

SIOUD, M. et al. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. **J Mol Biol**, v. 364, n. 5, p. 945-954, 2006.

SKALLOVA, A. et al. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. **J Immunol**, v. 180, n. 9, p. 6186-6192, 2008.

SOARES, A. C. et al. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **J Insect Physiol**, v. 52, n. 5, p. 468-472, 2006.

SOARES, A. C. et al. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: the challenge of blood intake from mouse skin. **Parasitol Int**, v. 63, n. 1, p. 229-236, 2014.

SOZZANI, S. et al. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. **J Immunol**, v. 159, n. 4, p. 1993-2000, 1997.

SOZZANI, S. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 6, p. 581-592, 2005.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol**, v. 9, n. p. 271-296, 1991.

STEINMAN, R. M. et al. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, n. p. 685-711, 2003.

STEINMAN, R. M. ; COHN, Z. A. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*1973. 137: 1142-1162. **J Immunol**, v. 178, n. 1, p. 5-25, 2007.

TEIXEIRA, A. R. et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 100-112, 2001.

TRAGER, W. Acquired resistance to ticks. **J Parasitol** v. 25, n. p. 57-81, 1939.

TRUMPER, E. V. ; GORLA, D. E. Density-dependent timing of defaecation by *Triatoma infestans*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 85, n. 6, p. 800-802, 1991.

TYSON, K. et al. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. **Insect Mol Biol**, v. 16, n. 4, p. 469-479, 2007.

TYSON, K. R. et al. A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. **J Immunol**, v. 180, n. 6, p. 3964-3968, 2008.

VALENZUELA, J. G. et al. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 25, p. 18717-18723, 2000.

VALENZUELA, J. G. et al. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. **J Exp Biol**, v. 204, n. Pt 2, p. 229-237, 2001.

VASSILIOU, E. et al. Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. **Cell Immunol**, v. 223, n. 2, p. 120-132, 2003.

VILLALOBOS, G. et al. The morphological variation of the eggs and genital plates of two morphotypes of *Triatoma protracta* Uhler, 1894. **J Vector Ecol**, v. 37, n. 1, p. 179-186, 2012.

WEICHSEL, A. et al. Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. **Nat Struct Biol**, v. 5, n. 4, p. 304-309, 1998.

YOSHIDA, S. et al. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2007-2014, 2008.

ZIPFEL, P. F. ; SKERKA, C. Complement regulators and inhibitory proteins. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 729-740, 2009.