

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

Lidiane Medeiros da Costa

**PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE ANÁLISE DE IMAGENS DA BOMBA  
CIBARIAL DE *RHODNIUS PROLIXUS* (HEMIPTERA: TRIATOMINAE) COM  
VISTAS A AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ALIMENTAR DO TRIATOMÍNEO  
FRENTE A DIFERENTES DIETAS**

Belo Horizonte

2021

Lidiane Medeiros da Costa

**PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE ANÁLISE DE IMAGENS DA BOMBA CIBARIAL DE  
*RHODNIUS PROLIXUS* (HEMIPTERA: TRIATOMINAE) COM VISTAS A AVALIAÇÃO DO  
DESEMPENHO ALIMENTAR DO TRIATOMÍNEO FRENTE A DIFERENTES DIETAS**

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

Área de concentração: Entomologia

Orientação: Marcos Horácio Pereira

Coorientação: Dra. Grasielle Caldas D'Ávila  
Pessoa

Belo Horizonte

2021

043

Costa, Lidiane Medeiros da.

Padronização de uma técnica de análise de imagens da bomba cibarial de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae) com vistas a avaliação do desempenho alimentar do triatomíneo frente a diferentes dietas [manuscrito] / Lidiane Medeiros da Costa. – 2021.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Marcos Horácio Pereira. Coorientação: Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Triatominae. 3. *Rhodnius*. 4. Comportamento de Busca por Hospedeiro. I. Pereira, Marcos Horácio. II. Pessoa, Grasielle Caldas D'Ávila. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO 428/11/2021**

**TÍTULO: "Padronização de Uma Técnica de Análise de Imagens da Bomba Cibarial de Rhodnius Prolixus (hemiptera: Triatominae) Com Vistas A Avaliação do Desempenho Alimentar do Triatomíneo Frente A Diferentes Dietas"**

**ALUNA: LIDIANE MEDEIROS DA COSTA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **trinta de julho de 2021**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Gabriel Cerqueira Alves Costa**

UNIFESP

**Sérvio Pontes Ribeiro**

UFOP

**Grasielle Caldas D'Avila Pessoa - Coorientadora**

UFMG

**Marcos Horácio Pereira- Orientador**

UFMG

Belo Horizonte, 30 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 30/08/2023, às 10:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2585695** e o código CRC **958D315B**.

Referência: Processo nº 23072.252857/2023-60

SEI nº 2585695

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Dr. Marcos Horácio Pereira e coorientação da Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

**COLABORADORES:**

Adriana Coelho Soares (ICB /UFMG)

Alberto de Figueiredo Gontijo (COLTEC/UFMG)

César Nonato (ICB /UFMG)

Leonardo Barbosa Koerich (ICB /UFMG)

Maurício Roberto Viana Sant'Anna (ICB /UFMG)

Nelder de Figueiredo Gontijo (ICB /UFMG)

Ricardo Nascimento Araújo (ICB /UFMG)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Olivia Medeiros da Costa, mulher guerreira e de fé, que apesar de todos os desafios e perdas, conseguiu manter a família forte e unida. Uma mulher de pouca instrução, mas, que com os exemplos me ensinou tudo que eu precisava aprender para ser uma mulher forte e honrada. Às minhas irmãs Lilian, o coração da família, e Lídia, a firmeza e a generosidade.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Ana Clara, Estevão, Emanuel, Eloá e Henrique que trazem luz e resgata minha fé na humanidade. É por vocês que me esforço todos os dias para ser uma pessoa melhor, uma “tia biogóla” que merecem.

À minha amiga, companheira, conselheira e os mais belos adjetivos que não cabem em único papel, minha pequena e ao mesmo tempo meu grande amor, Bruna Oliveira, que esteve comigo em todos os momentos, incluindo madrugadas acordada me ouvindo falar coisas que nem sempre entendia. E por, principalmente nunca ter me permitido pensar em desistir do meu sonho. Amo você e o que estamos construindo juntas.

Aos meus orientadores, Prof. Marcos Horácio Pereira e Profa. Grasielle Caldas. Vocês acreditaram na minha capacidade de começar a vida acadêmica quando tantos outros julgaram ser tarde demais, dando-me a oportunidade de realizar um sonho. Vocês foram amigos, conselheiros e até terapeutas quando precisei. Obrigada, por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida, que nos permitiram construir durante essa caminhada uma relação de orientação e de amizade.

À Dra. Adriana Coelho Soares e ao Dr. Alberto de Figueiredo Gontijo, pelas importantes contribuições nesse trabalho, sem as quais ele não teria acontecido.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Parasitologia e, em especial, à Sumara e Sibeles pela disponibilidade, atenção e auxílio. A todos os docentes, figuras essenciais para que a ciência continue sendo exercida. Aos colegas do LFIH agradeço por me receberem nessa grande família, mas, em especial ao César Nonato. Ao César que é a alma desse laboratório, sempre leal e dedicado a tudo e a todos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições ao trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e ao INCT-ENTOMOLOGIA, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na construção dessa dissertação.

## RESUMO

Os triatomíneos possuem importância médica por serem transmissores do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Trata-se de ectoparasitos temporários, cujo contato com seus hospedeiros é restrito ao momento do repasto sanguíneo, fonte única de nutrientes para eles. Além disso, é durante a alimentação sanguínea que os tripanossomatídeos circulam entre eles e os hospedeiros vertebrados. Nos triatomíneos a hematofagia é do tipo solenofágica, sendo que a maior parte do tempo durante a alimentação é dedicada a sucção do sangue pelo inseto, processo esse realizado pelas bombas faríngea (BF) e cibarial (BC). No presente estudo desenvolvemos uma metodologia de processamento de imagens obtidas nos experimentos de microscopia intravital da região da bomba cibarial (BC) na cabeça de *R. prolixus* e registradas em vídeo durante a alimentação *in vitro* (dietas com viscosidades distintas) e *in vivo* (pele de camundongo). Inicialmente, ninfas de 5º estágio foram alimentadas com duas dietas artificiais com diferentes viscosidades (Locke: 0,78 mPa e Dextran: 6,9 mPa, determinada à 60 rpm) contendo ATP (fagoestimulante) e Azul de Evans (para facilitar a visualização). A partir da curva da variação de cor nas regiões da BC e da BF na cabeça foi possível monitorar a atividade de bombeamento de líquidos durante a alimentação dos insetos. A alteração da viscosidade da dieta artificial (de 0,78 a 6,9 mPa) impactou negativamente na taxa de ingestão dos insetos, diminuindo a frequência da bomba cibarial e o tamanho do repasto sanguíneo deles. Foi elaborada uma planilha de cálculo para identificar os picos e os vales da curva da variação da cor apresentada pela BC em atividade, permitindo o cálculo do tempo de enchimento (T. Enc) e de esvaziamento (T. Esv) de cada ciclo de atividade da BC dos insetos. A partir destes tempos, foi possível introduzir em nossas análises outros parâmetros relacionados a atividade da BC (ex. período, velocidades de enchimento e esvaziamento). A comparação do desempenho de bombeamento dos insetos alimentados *in vitro* (Locke ou Dextran), nos três trechos avaliados (início, meio e fim), revelou diferença entre os parâmetros (frequência, T.Ench e T. Esv) no meio do repasto. O aumento da performance ao longo da alimentação apresentada pelos insetos alimentados com Locke e *in vivo* ocorreu de forma distinta, sendo em Locke mais duradouro e simétrico considerando o tempo alimentação, enquanto *in vivo* foi assimétrico com uma nítida tendência de diminuição dos valores a partir da segunda metade da alimentação. Tal diferença pode estar associada a resposta fisiológica do hospedeiro no sítio de alimentação. O padrão do deslocamento do líquido nas diferentes regiões de *Rhodnius prolixus* da BC sugere que a

ingestão de sangue neste inseto seja auxiliada por movimento peristáltico da parede elástica da bomba.

**Palavras-chave:** triatominae; *rhodnius prolixus*; hematofagia; bomba cibarial; microscopia intravital.

## ABSTRACT

Triatomines are of medical importance as they are vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. They are temporary ectoparasites whose contact with their hosts is restricted to the time of blood meal, their only source of nutrients. Furthermore, it is during blood feeding that the parasites circulate between them and vertebrate hosts. In triatomines, hematophagy is of the solenophagic type. During feeding, most of the time is dedicated to the suction of blood by the insect, a process carried out by the pharyngeal (FP) and cibarial (CP) pumps. In the present study, we developed a methodology for processing images obtained in intravital microscopy experiments of the CP in the head of *R. prolixus*. We recorded on video during the feeding *in vitro* (diets with different viscosities) and *in vivo* (skin of mouse). Initially, 5th instar nymphs received two artificial diets with different viscosities (Locke: 0.78 mPa and Dextran: 6.9 mPa, determined at 60 rpm) containing ATP (phagostimulant) and Evans Blue (to facilitate visualization). From the curve of color variation in the regions of CP and the FP in the head, it was possible to monitor the activity of pumping liquids during insect feeding. Changing the viscosity of the artificial diet (from 0.78 to 6.9 mPa) had a negative role on insect ingestion rate, decreasing the frequency of the CP and the size of their blood meal. A calculation sheet was created to identify the peaks and valleys of the color variation curve presented by BC activity, allowing the calculation of the filling time (T. Enc) and emptying (T. Esv) of each activity cycle of CP of insects. From these times, it was possible to introduce in our analysis other parameters related to CP activity (e.g., period, filling and emptying speeds, etc.). When comparing the pumping performance of insects fed *in vitro* (Locke or dextran) in the three stretches evaluated (beginning, middle, and end), differences were only observed between the parameters (frequency (f), T.Ench, and T. Esv ) middle of feeding. The performance increase during feeding presented by insects fed with Locke and *in vivo* presented a distinct profile. While, in the former group, it was more lasting and symmetric considering the feeding time, the bugs that feed in the host, the profile was asymmetric with a clear tendency to decrease the pumping performance from the second half of the feed. The explanation for this difference would be associated with the physiological response of the host at the feeding site. The pattern of fluid displacement in the different regions of the CP chamber suggests that blood ingestion in *R. prolixus* is aided by the peristaltic movement of the pump's elastic wall.

Keywords: triatomina; *rhodnius prolixus*; hematophagy; cibarial pump; intravital microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia de adulto de *Rhodnius prolixus* – vista dorsal (Fonte: Rafaela Paim - ICB/UFMG com modificações). 21
- Figura 2.** Desenvolvimento paurometábulo de *Rhodnius prolixus*, com cinco estádios ninfais, interpostos entre os estágios de ovo e adultos alados (macho ou fêmea) (Fonte: Rafaela Paim com modificações). 22
- Figura 3.** Desenho esquemático ilustrando o processo de penetração das peças bucais do triatomíneo na derme do hospedeiro. A. O lábio está ancorado pelos estiletes mandibulares, enquanto os estiletes maxilares penetram na derme. B. Os estiletes maxilares realizam movimentos à procura de um vaso sanguíneo (fase de sondagem). C. Os estiletes maxilares canulam o vaso e inicia a alimentação (fase de ingurgitamento) (Fonte: Lavopierre, 1959). 27
- Figura 4.** Tomografia computadorizada da cabeça de ninfa de 5º estágio de *Rhodnius prolixus*. A. Visão lateral da cabeça, setas brancas canto superior esquerdo indicam músculos dilatadores associados a bomba cibarial, seta branca centro inferior canal alimentar, em vermelho demarcação da bomba cibarial e em verde demarcação da bomba faríngea. B. Visão frontal da bomba cibarial seta em vermelho e musculatura associada seta branca (Fonte: Lahonderè *et al.*, 2017). 27
- Figura 5.** Preparação do camundongo *hairless* para ensaios de microscopia intravital. (Fonte: Soares 2004 com modificações). 34
- Figura 6.** Cabeça de *Rhodnius prolixus* com destaque para uma “máscara” (retângulo em amarelo) que delimita a região da bomba cibarial a ser analisada pelo software Image J. A) Bomba cibarial vazia; B) Bomba cibarial cheia; C) Dados gerados pelo software. 35
- Figura 7:** Curva típica da variação de cor apresentada pela região da bomba cibarial obtida de uma ninfa de 3ºestádio de *Rhodnius prolixus* durante o repasto sanguíneo na pele de camundongo *hairless*. Neste exemplo o experimento de alimentação foi gravado à 29 qps, ou seja, 29 quadros correspondem a um período de 1 segundo. 35
- Figura 8.** Exemplo de uma curva da média de cor (linha e círculos pretos) da bomba cibarial de uma ninfa de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* durante a alimentação em camundongo *hairless*, gerada pela planilha de cálculo desenvolvida para a identificação dos picos (círculos vermelhos) e vales (círculos verdes). Para a detecção dos picos e vales foram utilizadas fórmulas baseadas em três tamanhos de sequência de números: Dois 36

números (n1, n2 <n3> n4, n5), quatro (n1, n2, n3, n4<n5>n6, n7, n8, n9) ou seis números (n1, n2, n3, n4, n5, n6,<n7>n8, n9, n10, n11, n12, n13).

**Figura 9.** Variação média da cor em escala de cinza (0-255) apresentada pela bomba cibarial durante um período de 10 segundos da alimentação artificial de uma ninfa de ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus*. Neste exemplo a frequência estimada foi de 3,6 Hz (36 picos/10 segundos). As setas vermelhas indicam os picos e as setas pretas os vales. 39

**Figura 10.** Valores de frequência (Hz) observados nos diferentes trechos/vídeos dos experimentos de alimentação artificial sendo A- solução de Locke (LCK) e B - solução de Dextran (D23). 40

**Figura 11.** Exemplo de uma curva da média de cor (linha e círculos pretos) da bomba cibarial obtida de uma ninfa de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* durante a alimentação gerada pela planilha de cálculo desenvolvida para a identificação dos picos (círculos vermelhos) e vales (círculos verdes). A listagem da ordem e do momento (ms) de aparecimento de cada pico e de cada vale possibilitou o cálculo dos seguintes parâmetros da atividade da bomba cibarial: a) o período(ms) de cada ciclo: duração de tempo (ms) entre dois vales consecutivos (setas amarelas); b) o tempo de enchimento (T. Ench): duração de tempo (ms) entre um pico e o vale anterior (seta vermelhas); c) o tempo de esvaziamento (T. Esvaz): duração de tempo (ms) entre um pico e o vale posterior (seta verdes); d) frequência instantânea (Hz):  $1000/\text{Período (ms)}$ ; e) tempo relativo de enchimento (%):  $(\text{tempo de enchimento}/\text{período}) \times 100$ ; f) tempo relativo de esvaziamento (%):  $(\text{tempo de esvaziamento}/\text{período}) \times 100$ ; g) Velocidade de enchimento (Vel. Ench -  $\Delta \text{ cor}/\text{ms}$ ): diferença de cor entre um o pico e o vale anterior/ tempo de enchimento; h) Velocidade de esvaziamento (Vel. Esvaz -  $|\Delta \text{ cor}|/\text{ms}$ ): diferença de cor entre um o pico e o vale posterior/ tempo de esvaziamento. 41

**Figura 12.** Valores brutos dos parâmetros da atividade da bomba cibarial de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* alimentadas artificialmente com solução de Locke (A e B, n=3): ou Dextran (C e D, n=3) obtidos no início (I – 0-100%), no meio (M – 100-200%) e no fim (F – 200-300%). Cada trecho representa a análise de 10 segundos de imagens provenientes de experimentos de microscopia intravital da cabeça dos insetos captadas a 210 qps. 44

**Figura 13.** Coeficiente de variação (%) dos parâmetros médios gerais da atividade da bomba cibarial apresentados na Tabela 2. 44

**Figura 14.** Perfil de variação (%) dos parâmetros do ciclo de atividade da bomba cibarial ao longo da alimentação de ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* na pele de camundongo hairless. O tempo de alimentação do inseto foi dividido em 20 trechos, correspondendo a 5% do tempo total cada. A média dos valores por trecho de cada parâmetro foi calculada e determinada a sua variação (%) em relação ao valor da média de todo o tempo da alimentação (considerada 100%). (A) Frequência; (B) Período; (C) Velocidade de Enchimento; (D) Velocidade de Esvaziamento; (E) Tempo de Enchimento; (F) Tempo de Esvaziamento; (G) Variação de cor durante o Enchimento e o Esvaziamento. Cada ponto representa média de cinco experimentos ± o erro padrão. As linhas tracejadas representam a média geral dos cinco experimentos no tempo total da alimentação + (vermelha) ou - (azul) o seu intervalo de confiança à 95%. 48

**Figura 15.** Distribuição dos valores de frequência instantânea (Hz) pelo número de vezes que apareceram ao longo da alimentação de ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* (n=5) alimentados na pele da orelha de camundongo hairless. 49

**Figura 16.** Sequência de imagens da cabeça de uma ninfa de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* obtidas durante o repasto sanguíneo na pele de camundongo hairless mostrando a região da bomba cibarial. (A) Ciclo de enchimento/esvaziamento normal da bomba cibarial; (B) Ciclo de enchimento-esvaziamento apresentando “refluxo”. O experimento de alimentação foi gravado com a velocidade de 29 qps. Para facilitar a visualização da passagem do sangue pelo canal alimentar do inseto, primeiramente a imagem original em RGB foi convertida em “8bit green” (“split channels”). Em seguida, foi obtida uma imagem representando a “Max intensity” (“Z project”) de cada uma das duas sequências de imagens analisadas, e calculada a diferença entre a imagem “Max intensity” e a respectiva sequência de imagens (“Image calculator”). Finalmente, as imagens foram transformadas em “LUT fire”. A barra de cores representa a intensidade da escala de 51

cinza “*LUT fire*”. O círculo amarelo com linha pontilhada mostra a região visível da bomba faríngea na cabeça do inseto.

**Figura 17.** Curvas da variação de cor da bomba cibarial em atividade em 12 regiões da cabeça do triatomíneo. (A) Foto da cabeça de uma ninfa de *Rhodnius prolixus* mostrando as 12 regiões selecionadas (a área de cada região equivale 5777 pixels); (B) Curvas das 12 regiões selecionadas. O experimento de alimentação foi gravado com a velocidade de 29 qps. Para facilitar a visualização da passagem do sangue pelo canal alimentar do inseto, primeiramente a imagem original em RGB foi convertida em “*8bit green*” (“*split channels*”). Em seguida, foi obtida uma imagem representando a “*Max intensity*” (“*Z project*”) da sequência de imagens analisadas, e calculada a diferença entre a imagem “*Max intensity*” da sequência de imagens (“*Image calculator*”).

**Figura 18.** Curvas da variação de cor da bomba cibarial em atividade em 12 regiões da cabeça do triatomíneo. (A) Curvas das regiões 4 e 9; (B) Curvas da bomba cibarial, da bomba faríngea e das regiões 4 e 9 durante um ciclo de enchimento-esvaziamento normal; (C) Curvas da BC, BF e das regiões 4 e 9 durante um ciclo de enchimento-esvaziamento apresentando “refluxo”. O experimento de alimentação foi gravado com a velocidade de 29 qps. Para facilitar a visualização da passagem do sangue pelo canal alimentar do inseto, primeiramente a imagem original em RGB foi convertida em “*8bit green*” (“*split channels*”). Em seguida, foi obtida uma imagem representando a “*Max intensity*” (“*Z project*”) da sequência de imagens analisadas, e calculada a diferença entre a imagem “*Max intensity*” da sequência de imagens (“*Image calculator*”). O retângulo amarelo com linha pontilhada mostra o registro das curvas no momento do refluxo, onde se observa que houve a contração quando o sangue ocupa apenas a região 4 da bomba cibarial.

**Figura 19.** Esquema do corte longitudinal da região posterior da bomba cibarial (“faringe” - PH) e o início do esôfago (OE) mostrando o processo de ingestão do sangue. (A) Momento em que as últimas fibrilas do 2º grupo de músculos dilatadores da BC (MU2) se contraíram e uma gota de sangue foi sugada para trás. A válvula (VP) está fechada, uma vez que 3º grupo de músculos dilatadores da bomba cibarial (MU3) está relaxado. (B) Momento em que as últimas fibrilas do MU2 estão se relaxando, e a parede (“teto”) elástica retorna a sua posição original da BC empurrou (pelo “fechamento” da cavidade da bomba nesta região) a gota sanguínea pela válvula (VP) aberta pela contração de MU3 para dentro do esôfago (“BF”), cujo primeiro grupo dos músculos

anelares (MUR) é relaxado enquanto o músculo dilatador do esófago se contraiu (MU17). Pela contração dos músculos anelares (MUR) anteriores e do músculo dilatadores do esófago (MU17), e a dilatação dos músculos anelares posteriores localizados posteriormente (como aparece em A), continua o movimento do alimento em direção ao intestino médio anterior”. Extraído de Barth (1952). Legenda: (GB) Gânglio subesofágico; (GP) Gânglio supraesofágico; (KW) Parede crânica (“crânea”).

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros alimentares de ninfas de 3° estágio de *Rhodnius prolixus* 38  
alimentados em duas dietas artificiais com viscosidade diferente: solução de Locke  
(LCK, n=3) com viscosidade de 0,78 mPa e solução de Dextran 0,23g/ml (D23, n=3)  
com viscosidade de 6,9 mPa (teste T,  $p < 0,05$ ).
- Tabela 2.** Parâmetros da atividade da bomba cibarial de ninfas de 5° estágio de 43  
*Rhodnius prolixus* alimentadas artificialmente com solução de Locke (LCK, n=3) ou  
Dextran (D23, n=3) no início (I), no meio (M) e no fim (F) da alimentação. Cada trecho  
representa a análise de 10 segundos de imagens provenientes de experimentos de  
microscopia intravital da cabeça dos insetos registradas a 210 qps .
- Tabela 3.** Dados gerais dos experimentos de alimentação de ninfas de 3° estágio de 45  
*Rhodnius prolixus* (n=5) alimentadas na pele da orelha de camundongo *hairless*, sendo  
informado o tempo total de alimentação (min), o tempo de interrupções (min) e o  
número de ciclos da bomba cibarial.
- Tabela 4.** Comparação dos parâmetros da atividade da bomba cibarial apresentada por 46  
ninfas de 3° estágio de *Rhodnius prolixus* (n=5) durante o repasto sanguíneo na pele da  
orelha de camundongo *hairless*.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BC	-	Bomba Cibarial
BF	-	Bomba Faringiana
cm	-	Centímetro
cP	-	Centipoise
D23	-	Dextran
DC	-	Doença de Chagas
F	-	Frequência
FI	-	Fase de ingurgitamento
FS	-	Fase de sondagem
GP	-	Ganho de peso
Hz	-	Hertz
LCK	-	Locke
LFIH	-	Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos
M	-	Molar
min	-	Minutos
ms	-	Milissegundos
mM	-	Milimolar
mm	-	Milímetro
mPA	-	Milipascal
NIPs	-	Nitroforinas
nl	-	Nanolitros
NV	-	Ninfa de quinto estágio
PI	-	Período ingestivo
PNI	-	Período não ingestivo
QLC	-	Quantidade de líquido ingerido por contração da bomba cibarial
qps	-	Quadros por segundo
RGB	-	Sistema de cores aditivas – Vermelho, Verde, Azul
RNAi	-	Técnica de silenciamento do RNA interferente
rpm	-	Rotação por minuto
sec	-	Segundos

TCT	-	Tempo de contato total
TIE	-	Taxa de ingestão efetiva
TIT	-	Taxa de ingestão total
UR	-	Umidade relativa
T. Ench	-	Tempo de enchimento
T. Esvaz	-	Tempo de esvaziamento
$\mu\text{l}$	-	Microlitro
$\mu\text{M}$	-	Micromolar
~	-	Aproximadamente
$\pm$	-	Desvio Padrão
$\Delta$	-	Varição
%	-	Percentual
$^{\circ}\text{C}$	-	Grau Célsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
1.1. Triatomíneos: aspectos gerais	20
1.2. Hematofagia com ênfase nos triatomíneos	24
1.2. 1. A dinâmica de sucção do sangue pelos triatomíneos	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	30
<b>3. OBJETIVOS</b>	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
4.1. Material Biológico	33
4.1.1. <i>Rhodnius prolixus</i>	33
4.1.2. Hospedeiro mamífero	33
4.2. Análise da atividade da bomba cibarial durante a hematofagia de <i>Rhodnius prolixus in vitro</i> frente a dietas com diferentes viscosidades	34
4.3. Detecção de picos e vales da curva de variação de cor da bomba cibarial em funcionamento de <i>Rhodnius prolixus</i>	36
4.4. Análise da atividade da bomba cibarial durante a hematofagia de <i>Rhodnius prolixus</i> em hospedeiro mamífero	37
4.5. Análises Estatísticas	38
<b>5. RESULTADOS</b>	38
5.1. Alimentação <i>in vitro</i>	38
5.1.1. Caracterização dos ciclos da atividade da bomba cibarial de <i>Rhodnius prolixus</i>	41
5.2. Alimentação <i>in vivo</i>	45
5.2.1. Caracterização dos ciclos de atividade da bomba cibarial de <i>Rhodnius prolixus</i>	50
<b>6. DISCUSSÃO</b>	54
<b>7. CONCLUSÕES</b>	61
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	62

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Triatomíneos: aspectos gerais

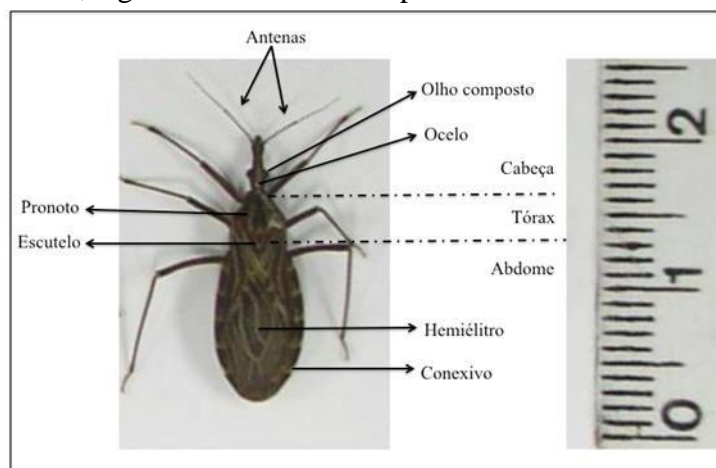
Os triatomíneos possuem importância médica por serem transmissores do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (DC) (Chagas, 1909). Atualmente a DC é endêmica em 21 países da América Latina sendo sua distribuição coincidente às áreas nas quais existem os triatomíneos. Trata-se de uma doença considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde, com 10 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e cerca de 65 milhões expostas ao risco de contaminação (OPAS, 2019). Adicionalmente, estima-se, por ano, a ocorrência de 28 mil novas infecções por transmissão vetorial em tais regiões. É importante mencionar que nas últimas décadas, houve a dispersão da DC para áreas não endêmicas nas quais estimam-se 400 mil pessoas infectadas pelo de *T. cruzi* (OMS, 2020).

Os triatomíneos são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo conhecidos popularmente no Brasil como barbeiros. Até o momento estão descritas aproximadamente 150 espécies de triatomíneos, agrupadas em 18 gêneros, as quais apresentam as mais variadas características comportamentais e ecológicas, sendo *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma* os gêneros de maior importância epidemiológica. À exceção do gênero *Linshcosteus* e algumas espécies do gênero *Triatoma*, os demais triatomíneos são exclusivos das Américas (Dujardin *et al.*, 2015). Referindo-se ao Brasil, aproximadamente 66 espécies de triatomíneos estão presentes no território nacional, sendo cinco espécies classificadas como aquelas que têm, ou tiveram, participação mais relevante na transmissão domiciliar do *T. cruzi*, a saber: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (Costa *et al.*, 2021).

Os barbeiros apresentam o corpo achatado dorso-ventralmente, com comprimento variando entre 2 a 3 cm. A cabeça é alongada, com formato fusiforme. A probóscide é reta, trisegmentada e curta (não ultrapassando a inserção do primeiro par de patas) com a extremidade distal repousando no sulco estrudulatório - situado a porção ventral do tórax. Possuem um par de olhos compostos, um par de ocelos e um par de antenas tetrsegmentadas. Observa-se um pescoço nítido unindo a cabeça ao tórax. Por sua vez, de cada segmento do tórax (protórax, mesotórax e metatórax), ventralmente, tem-se a inserção de um par de patas. Além disso, observa-se o sulco estrudulatório (à exceção das espécies pertencentes aos

gêneros *Linshcosteus* e *Cavernicola*). Ainda no tórax, dorsalmente, tem-se o pronoto (em formato de trapézio) seguido pelo escutelo (formato triangular), e dois pares de asas saindo do último segmento torácico (par anterior do tipo hemiélitro e o par posterior, membranoso). Já o abdômen é alongado e ovoide, sendo formado por escleritos dorsais (tergitos) e ventrais (esternitos), bem como, a genitália do inseto. A parte lateral do abdômen é o conexivo (Fig. 1)

(Forattini,



1982).

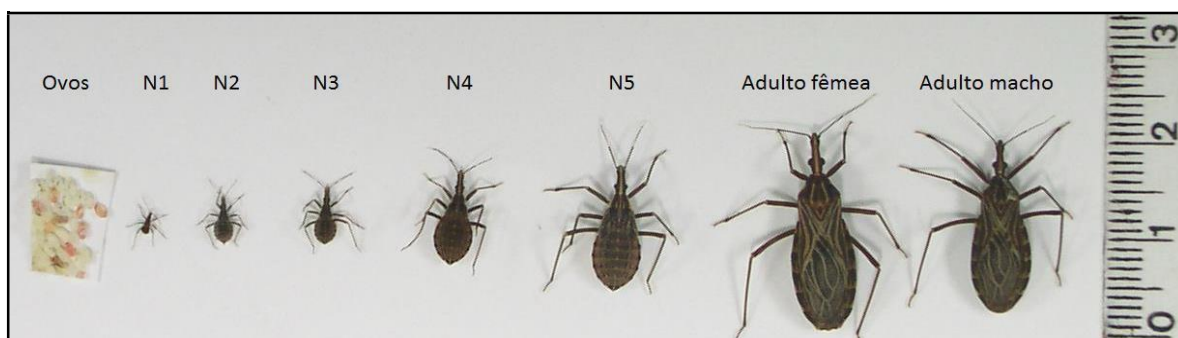
**Figura 1.** Morfologia de adulto de *Rhodnius prolixus* – vista dorsal (Fonte: Rafaela Paim - ICB/UFMG com modificações).

Trata-se de insetos que apresentam o ciclo de vida do tipo paurometábulo, com cinco estádios ninfais, interpostos entre os estágios de ovo e adultos alados (machos ou fêmeas), com tempo médio de vida de 2 anos (Fig. 2). O período de desenvolvimento varia entre as espécies, estando diretamente relacionado à temperatura, umidade e à disponibilidade de alimentação sanguínea. Em condições favoráveis, a reprodução ocorre durante todo o ano. A fêmea inicia a postura aproximadamente entre 2 a dias após a copula, ocorrendo repetidamente durante a vida (3-18 meses). Os ovos podem ser colocados soltos ou aderidos ao substrato, a depender da espécie, podendo uma única fêmea colocar de 100 a 600 ovos/vida. Os ovos são operculados com tamanho variável a depender da espécie de triatomíneo. Logo após a postura, eles apresentam coloração branco-leitosa, mudando de tonalidade com o passar do tempo, apresentando-se em cores rosadas cada vez mais escuras quando próximo da eclosão. O período de incubação dos ovos é de aproximadamente 20 dias. Dos ovos emergem as formas imaturas, conhecidas por ninfas, que evoluem por cinco estádios até atingirem a fase de adulto. Assim que eclodem, as ninfas apresentam tegumento frágil, com coloração rosada, que com o passar do tempo, se endurece alterando a cor para marrom ou preto, a depender da espécie. Esse fenômeno também é observado logo após as

ecdises. As ninfas se diferenciam dos adultos pelo seu menor tamanho; pela ausência de ocelos, de asas (exceto *Mepraia spinolai*), da fosseta esponjosa (exceto os gêneros *Microtriatoma* e *Parabelmuns*), de tarsos dímeros e por apresentarem genitália externa não desenvolvida. A partir do 5º estágio, os últimos segmentos da ninfa se modificam para formar as genitálias, já sendo possível distinguir os sexos: ventralmente, os machos apresentem o último segmento arredondado enquanto na fêmea ele é menor e alongado. Finalmente as ninfas se transformam em adultos. Os adultos apresentam 2 pares de asas e marcado dimorfismo sexual sendo que as fêmeas apresentam o conexivo interrompido pelo ovipositor, enquanto nos machos ele é contínuo. É importante destacar que as fêmeas geralmente são maiores que os machos. Os adultos copulam várias vezes durante a vida. Durante a cópula, o macho fertiliza a fêmea depositando nela os espermatóforos contendo os espermatozoides. Uma vez fecundada a fêmea permanece fértil por toda a vida. É importante ressaltar que entre as fases de desenvolvimento, os triatomíneos precisam se alimentar de sangue para que ocorra a ecdise. A distensão abdominal e os nutrientes provenientes do sangue ativam as células neurosecretoras que se desdobram na produção dos hormônios que estimulam a ecdise (ecdisona) e o crescimento do inseto (hormônio juvenil). Nos estágios mais jovens (ninfas de primeiro a terceiro estádios) um único repasto sanguíneo garante a muda, contudo, a partir do quarto estágio ninfal é necessário mais de um repasto (Lent & Wygodzinsky, 1979).

**Figura 2.** Desenvolvimento paurometábulo de *Rhodnius prolixus*, com cinco estádios ninfais, interpostos entre os estágios de ovo e adultos alados (macho ou fêmea) (Fonte: Rafaela Paim -ICB/UFMG com modificações).

Como mencionado anteriormente, os triatomíneos exercem hematofagia obrigatória, do



tipo solenofágica, em todas as fases do desenvolvimento pós embrionário (Lavoipierre *et al.*, 1959), demonstrando preferência por animais homeotérmicos, embora o relato da associação com répteis e outros animais pecilotérmicos tenha sido descrita (Dias 2011). Algumas espécies são consideradas especialistas, alimentando-se preferencialmente de uma única fonte (exemplares do gênero *Psammolestes* associados a ninhos de Furnariidae e do gênero *Cavernicola* com morcegos) enquanto a maioria é generalista sem preferência alimentar,

sendo adotada como fonte alimentar os animais homeotérmicos e, eventualmente, alguns répteis (Lavoipierre *et al.*, 1959; Forattini, 1984; Galvão, 2003; Galvão, 2014). É interessante destacar que apesar do hábito alimentar hematófago, já foram relatadas nos triatomíneos a ocorrência do canibalismo, coprofagismo (Schaub *et al.*, 1988), cleptohematofagia e hemolinfagia (Alves *et al.*, 2011).

Trata-se de insetos bastante resistentes às variações de temperatura, o que lhes permite colonizar uma ampla gama de ecótopos (Marcondes, 2001), desde a estabilidade do ambiente domiciliar (intra ou peridomicílio) a maiores variações no ambiente silvestre (ex. rochas, palmeiras, tocas de animais) (Schofield & Galvão, 2009). Apresentam uma maior atividade noturna, quando saem dos abrigos em busca do repasto sanguíneo e, no início da manhã voltam aos seus esconderijos (Lorenzo & Lazzari, 1998).

Todos os triatomíneos, desde que infectados pelo *T. cruzi*, podem transmiti-lo, contudo, a capacidade vetorial de cada espécie depende: i) da preferência alimentar, ii) da dinâmica de dejeção de fezes, ou seja, intervalo de tempo entre alimentação e a dejeção, iii) do grau de antropofilia (Zeledón, 1977). Dentro deste contexto, o *Rhodnius prolixus* se destaca em relação a maioria das espécies estudadas.

*R. prolixus* é o principal triatomíneo vetor do *T. cruzi* no norte da América do Sul (Colômbia e Venezuela) e em alguns países da América central (Honduras, Guatemala e El Salvador). Trata-se de uma espécie associada principalmente ao peridomicílio, sendo encontrado em galinheiros, pombais e junto a roedores e aves em palmeiras (Lent & Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1994).

O ciclo de desenvolvimento de *R. prolixus*, em condições de laboratório (28°C e 52-94% UR) é de aproximadamente 121 dias (Ponsoni *et al.*, 2006). Os ovos apresentam substância adesiva, sendo colocados pelas fêmeas, aderidos ao local de postura. A diferenciação entre os estádios ninfais pode ser realizada a partir do tamanho da cabeça dos insetos, mantendo-se semelhante do 1º ao 4º estágio, e maior e semelhante entre a ninfa de 5º estágio (NV) e os adultos. A NV apresenta o broto alar. Os adultos, por sua vez, medem aproximadamente 3 cm, apresentam genitália desenvolvida e coloração castanha e preta que pode ser facilmente confundida com outras espécies do gênero (Fig. 2) (Buxton, 1930; Lent & Valderrama, 1977; Silva, 1988; Luz *et al.*, 1999; Ponsoni *et al.*, 2006).

Desde a década de 1940 *R. prolixus*, tem sido um importante modelo experimental para estudos de biologia, fisiologia e genômica, considerando o bom desempenho alimentar da espécie, o que impacta em seu ciclo de vida em laboratório, tornando-o relativamente curto quando comparado a outras espécies de triatomíneos, facilitando, assim, a sua manutenção em

condições de insetário. Adicionalmente, é relevante mencionarmos a existência de um significativo montante de informações disponíveis na literatura sobre a espécie, destacando-se o seu genoma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), conhecimento esse que inegavelmente abriu novas perspectivas para a compreensão da biologia deste vetor (Wigglesworth, 1940; Mesquita *et al.*, 2015; Lazzari, 2017).

## 1.2. Hematofagia com ênfase em triatomíneos

Mais de metade da população mundial habita em regiões de risco de infecção de doenças cujo agente etiológico é transmitido por artrópodes hematófagos (“vector-borne diseases”) (WHO, 2020). De maneira geral, é durante a hematofagia que o agente etiológico circula entre o hospedeiro vertebrado e o seu vetor. Além disso, o sangue obtido pode representar a única fonte de nutrientes para alguns insetos (ex. triatomíneos, piolhos, percevejos) ou servir de estímulo para a produção de ovócitos (ex. flebotomíneos e mosquitos). Portanto, diferenças no desempenho alimentar interferem diretamente na competência vetorial e/ou na dinâmica populacional de insetos vetores.

A hematofagia é uma estratégia de alimentação pouco difundida entre os artrópodes. Entre os insetos estima-se que haja cerca de 14.500 espécies hematófagas distribuídas entre as ordens Díptera, Hemíptera, Siphonaptera, Lepidoptera e Phthiraptera (Ribeiro & Arca, 2009). Acredita-se que a alimentação sanguínea surgiu em pelo menos 20 ocasiões distintas no curso da evolução dos artrópodes (Wheeler *et al.*, 2001). Isso deu origem a uma série de adaptações fisiológicas independentes, mas funcionalmente convergentes, a fim de resolver problemas comuns relacionado ao hábito hematófago, tais como um aparelho de alimentação morfologicamente especializado (Black e Kondratieff, 2005) e uma variedade de biomoléculas salivares (Ribeiro e Francischetti, 2003; Valenzuela, 2004) que ajudam a viabilizar a tomada de sangue a partir da pele dos hospedeiros vertebrados.

Embora existam diferenças marcantes (morfológicas, comportamentais, tipos de hospedeiro) que interferem no processo de obtenção do repasto sanguíneo entre os grupos de artrópodes hematófagos, todos enfrentam três desafios fundamentais: a penetração das peças bucais através da epiderme do hospedeiro, a localização do sangue na derme e o bombeamento dele para o interior do seu tubo digestivo.

Após vencer a barreira da epiderme, os artrópodes hematófagos precisam colocar a abertura do canal alimentar (“boca funcional”) em contato com o sangue. Para acessar o sangue na pele do hospedeiro, existem dois mecanismos básicos: a solenofagia (ou “vessel-

feeding”) e a telmofagia (ou “pool-feeding”) (Lavoipierre, 1965). Na solenofagia, a abertura do canal alimentar é introduzida diretamente na luz dos vasos sanguíneos, sendo esse tipo de hematofagia realizada por barbeiros, piolhos, pulgas e mosquitos. Nesses grupos de insetos, as mandíbulas e/ou maxilas foram modificadas para formar estiletes longos, finos e perfurantes que são interconectados para formar um tubo longo por onde o sangue é sugado. Diferentemente, na telmofagia os artrópodes posicionam a abertura do canal alimentar dentro de uma pequena poça de sangue formada pelo rompimento dos vasos pela ação das peças bucais adaptadas para rasgar, dilacerar ou cortar a pele do hospedeiro. Essas peças bucais são encontradas em flebotomíneos, tabanídeos, simulídeos e moscas picadoras (Lehane, 2005).

Depois de localizar o sangue, os insetos precisam bombeá-lo dos vasos sanguíneos do hospedeiro para seu intestino, onde o repasto é inicialmente armazenado. Até o momento, poucos modelos foram propostos para descrever a mecânica da alimentação de sangue, principalmente levando em consideração as características físicas das peças bucais (diâmetro / comprimento da parte inicial do canal alimentar) e a diferença de pressão gerada pelas bombas de alimentação do inseto (Kornev *et al.*, 2017).

Na ordem Hemiptera, a presença de peças bucais perfurantes e de bombas de alimentação possibilita a ingestão de diferentes dietas líquidas. Embora a maioria das espécies da subordem Heteroptera seja fitófaga ou predadora, o hábito hematofágico obrigatório está presente em três famílias (Cimicidae, Polytetenidae e Reduviidae). A família Reduviidae apresenta o maior número de espécies hematófagas (~150) estando todas agrupadas na subfamília Triatominae (Cobben, 1978; Costa *et al.*, 2021).

Por se tratar de insetos hematófagos em todos os estágios de vida pós-embrionário, para os triatomíneos, o sangue constitui a única fonte de alimentação, indispensável ao desenvolvimento dos mesmos. Por serem insetos de tamanho relativamente grande, necessitam de quantidades consideráveis de sangue em todos os seus estágios de desenvolvimento (Schofield, 1994). À título de exemplificação, enquanto uma fêmea adulta de *T. infestans* ingere ~350 µl de sangue em um único repasto (Guarneri *et al.*, 2000), o volume de sangue ingerido por uma fêmea de *Anopheles* e de *Glossina* é de aproximadamente 2 µl e 30 µl, respectivamente (Lehane, 1991).

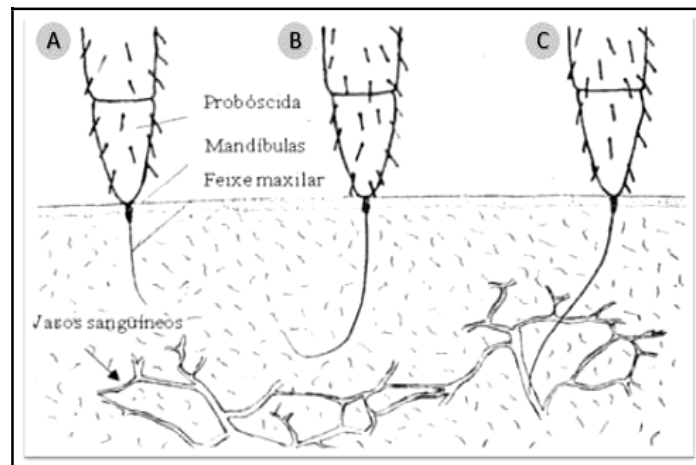
Embora os triatomíneos sejam ecléticos em relação as espécies de vertebrados que utilizam como hospedeiro, geralmente eles se alimentam em aves e em mamíferos. A procura da fonte alimentar pelos triatomíneos geralmente acontece nas primeiras horas da fase escura sendo tal modulação diária controlada por um mecanismo de relógio endógeno (Barrozo *et al.*, 2004a). O encontro da fonte alimentar pelos triatomíneos ocorre através de pistas térmicas

(calor e umidade) e/ou químicas (caimônios: dióxido de carbono, o ácido láctico e vários ácidos graxos de cadeia curta) (Núñez, 1982; Lazzari & Núñez, 1989; Taneja & Guerin, 1995; Taneja & Guerin, 1997; Schmit, 2000; Barrozo & Lazzari, 2004<sup>a</sup>; Barrozo & Lazzari 2004b; Barrozo & Lazzari, 2006). Dessas, a principal pista usada pelos triatomíneos é o calor radiante emitido pelos animais de sangue quente, estando as antenas envolvidas na aquisição de informação térmica sobre a fonte alimentar a partir da detecção da radiação infravermelha emitida pelo hospedeiro (Lazzari & Núñez, 1989) A pista térmica por si só é capaz de induzir os insetos a expressar o reflexo de extensão de probóscide e, conseqüentemente, a picar objetos quentes (Lazzari & Nuñez, 1989; Flores & Lazzari, 1996; Wigglesworth & Gillett, 1934). Em sua ausência, outras pistas podem induzir orientação (Núñez, 1987; Taneja & Guerin, 1995; Guerenstein & Guerin, 2001), mas não a resposta de picada e a alimentação (Lazzari, 1990). Wigglesworth & Gillet (1934) descreveram que *R. prolixus* é atraído por fontes térmicas com temperatura entre 35 °C à 38 °C. Destaca-se que a percepção da irradiação infravermelha também é usada pelos triatomíneos para detectar os vasos sanguíneos na pele dos hospedeiros (Ferreira *et al.*, 2007).

Por fazerem solenofagia, após o encontro do hospedeiro, os triatomíneos utilizam o seu aparato bucal picador-sugador para retirar o sangue diretamente dos vasos sanguíneos (vênulas ou arteríolas). Nesses insetos, a probóscide é composta por um lábio trisegmentada que engloba um par de mandíbulas e um par de maxilas, ambas longas e em forma de agulha. As pontas das mandíbulas têm uma fileira de dentes nas bordas, enquanto as maxilas são mais finas e possuem estruturas mais suaves (sem dentes ou cerdas). Cada estilete das maxilas se articula para formar dois canais independentes: um alimentar central e um alimentar estreito. Tais peças bucais permitem um corte limpo da epiderme pelas mandíbulas do inseto e, por conseqüência, uma menor destruição celular durante os movimentos da maxila na derme dos hospedeiros vertebrados (Lavoipierre *et al.*, 1959).

Durante a hematofagia, as mandíbulas do triatomíneo ancoram o fascículo na superfície da pele, enquanto as maxilas, que são controladas por grandes músculos associados à sua base, penetram na derme, mediante fortes movimentos, atuando como um par de lâminas de corte (Fig. 3A). Após a penetração na derme, as maxilas permanecem juntas, realizando movimentos oscilatórios, do tipo chicote, à procura do vaso sanguíneo (fase de sondagem - FS) (Fig. 3B). Segundo Friend & Smith (1971), durante a fase de sondagem, *R. prolixus* retira periodicamente amostras do líquido que rodeia a ponta das maxilas, analisando-o com os quimiorreceptores epifaríngeos. Detectando o vaso sanguíneo, as maxilas atuam como uma agulha, canulando-o. Nesse momento, a maxila esquerda coloca-se numa posição retraída em

relação à direita, formando a “boca funcional”, dando início a sucção do sangue (fase de ingurgitamento-FI) (Fig. 3C) (Lavoipierre *et al.*, 1959).



**Figura 3.** Desenho esquemático ilustrando o processo de penetração das peças bucais do triatomíneo na derme do hospedeiro. A. O lábio está ancorado pelos estiletos mandibulares, enquanto os estiletos maxilares penetram na derme. B. Os estiletos maxilares realizam movimentos à procura de um vaso sanguíneo (fase de sondagem). C. Os estiletos maxilares canulam o vaso e inicia a alimentação (fase de ingurgitamento) (Fonte: Lavoipierre, 1959).

A sucção do sangue nos triatomíneos é realizada com auxílio das bombas faríngea (BF) e Cibarial (BC) (Fig. 4). Dependendo do diâmetro do vaso sanguíneo canulado, é possível observar a vibração de suas paredes durante a ingestão de sangue (Lavoipierre *et al.* 1959; Soares *et al.* 2014). É importante destacar a possibilidade de que em algum momento o triatomíneo interrompa a ingestão do sangue sem retirar, contudo, as peças bucais da pele do hospedeiro, permanecendo com as bombas usadas para sugar o sangue inativas. À exceção da interrupção, todos os outros eventos supracitados aparecem pelo menos uma vez durante o repasto sanguíneo.



**Figura 4.** Tomografia computadorizada da cabeça de ninfa de 5º estágio de *Rhodnius prolixus*. A. Visão lateral da cabeça, setas brancas canto superior esquerdo indicam músculos dilatadores associados a bomba cibarial, seta branca centro inferior canal alimentar, em vermelho demarcação da bomba cibarial e em verde demarcação da

bomba faríngea. B. Visão frontal da bomba cibarial seta em vermelho e musculatura associada seta branca (Fonte: Lahonderè *et al.*, 2017).

De maneira geral, ao introduzirem suas peças bucais na pele do hospedeiro em busca de sangue, os triatomíneos, tal como outros artrópodes hematófagos, induzem no hospedeiro várias reações reparadoras ou de defesa (Ribeiro & Franschetti, 2003). Entre elas estão a agregação plaquetária, a contração do vaso lesado, a coagulação sanguínea (os três mecanismos da hemostasia), o aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia leucocitária (Ribeiro & Franschetti, 2003). Além disto, as reações inflamatórias e de hemostasia podem ser exacerbadas com o desenvolvimento de uma resposta imune contra os antígenos presentes na saliva destes artrópodes. Portanto, durante a hematofagia, podem ser promovidas algumas ou todas estas reações, dificultando a ingestão de sangue pelo inseto ou até mesmo, desencadeando o comportamento defensivo do hospedeiro (Ribeiro, 1987, 1995). Por outro lado, a presença de diversas moléculas bioativas presentes na saliva do inseto pode facilitar a alimentação, pensando-se desde a canulação do vaso sanguíneo até a ingestão de sangue (Ribeiro & Garcia 1980, Ribeiro & Francischetti, 2003).

Nos triatomíneos, o padrão de salivação ocorre durante toda a hematofagia, contudo, de forma distinta. Em *R. prolixus*, a salivação começa logo após a picada e continua até o final do repasto (Friend & Smith 1971), apresentando dois padrões distintos. Durante a FS, a salivação é abundante e constante, enquanto que durante a FI, a saliva é liberada lentamente nos vasos sanguíneos em pulsos de baixa frequência (Soares *et al.*, 2006; Sant`Anna *et al.*, 2007). Parte da saliva liberada pelo triatomíneo é ingerida juntamente com o sangue, permitindo que as biomoléculas salivares atuem sobre o alimento armazenado no intestino do inseto (Ribeiro & Garcia, 1980; Soares *et al.*, 2006).

### **1.2.1. A dinâmica de sucção do sangue nos triatomíneos**

Os triatomíneos são ectoparasitos temporários e o contato com seus hospedeiros é restrito ao momento do repasto sanguíneo. A hematofagia para esses insetos é importante considerando que o sangue é a única fonte de nutrientes. Além disso, é durante a alimentação sanguínea que os tripanossomatídeos circulam entre eles e os hospedeiros vertebrados.

Do tempo de contato total do triatomíneo com a fonte alimentar, 20% são dedicados a sondagem do inseto na pele do hospedeiro, momento esse onde não há ingestão de sangue,

sendo, contudo, um período crítico, pois é nele que o inseto pica o hospedeiro, podendo ser percebido e morto. Dessa forma, os demais 80% são dedicados a ingestão sanguínea (Schofield *et al.*, 1986). Nesse contexto, espécies com melhores taxas de ingestão efetiva apresentam uma melhor capacidade para explorar os hospedeiros disponíveis nas habitações humanas, atingindo densidades populacionais mais elevadas. Esses fatores, em conjunto, as tornam espécies com melhor competência vetorial, a exemplo do *Triatoma infestans* e do *R. prolixus* na América do Sul e Central, respectivamente (Sant`Anna *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2006).

Um fator que interfere na performance alimentar dos triatomíneos é a viscosidade do sangue. Do ponto de vista mecânico, o sangue pode ser considerado uma suspensão sólido-liquida, com os elementos celulares (principalmente os glóbulos vermelhos) sendo a fase sólida. A viscosidade aparente do sangue depende das forças de deformação existentes (já que o sangue se comporta como um fluido não newtoniano), sendo determinada por fatores como o hematócrito no sangue (% de hemácias por volume), viscosidade plasmática, agregação plaquetária e deformabilidade das hemácias. A viscosidade do sangue dos vertebrados diminui com a redução do hematócrito e com o aumento da temperatura e das taxas de cisalhamento. Os glóbulos vermelhos tendem a se agregar e aderir um ao outro (agregação dos eritrócitos) com intensidade variável entre as espécies. Quanto menos agregados houver, mais facilmente a suspensão pode se mover ao longo do vaso sanguíneo (Kingsolver & Daniel, 1995; Baskurt & Meiselman, 2003).

Adicionalmente, a avaliação da efetividade do comportamento alimentar dos triatomíneos deve considerar a interação inseto (intestino anterior) - hospedeiro (sangue). Isso se justifica porque o canal alimentar é contínuo e o sangue não é passível de compressão. Dessa forma, qualquer obstáculo ao fluxo de sangue, desde a boca funcional até o intestino anterior, vai interferir na taxa de ingestão sanguínea. Assim que ingerido, o sangue é estocado no intestino médio anterior dos triatomíneos, dentro da membrana perimicrovilar, a partir do qual a água e íons serão transportados para os Túbulos de Malpighi e para a hemolinfa. O sangue concentrado, será então transferido lentamente, em pequenas quantidades, para o intestino médio posterior do inseto, onde será digerido (Kollien & Schaub, 2000). O tempo necessário para a digestão varia entre as espécies de triatomíneos, em resposta as condições ambientais às quais esses insetos estão expostos. O sangue deve permanecer fluido o suficiente durante a ingestão do sangue, pois a contrapressão induzida pela viscosidade aumentada causada pelo coágulo sanguíneo impedirá um bombeamento bem-sucedido de sangue para o intestino. Uma vez iniciada a cascata de coagulação sanguínea, ocorre um rápido aumento de viscosidade

(Pucket *et al.*, 2005). Nesse sentido, Araújo *et al.* (2007) utilizando a técnica do RNAi, silenciaram a brasiliensina, um inibidor de trombina. Em resposta, os autores observaram redução no GP (~39%-55%). Quando dissecados, observaram-se coágulos no material presente no intestino anterior, quando comparados aos insetos controle cujo sangue, apenas agitado, tinha o material facilmente dissolvido. A dificuldade de alimentação observada nos triatomíneos silenciados pode ser revertida com o tratamento dos camundongos com heparina (Paim *et al.*, 2011). Contudo, é importante mencionar que os insetos silenciados para a brasiliensina realizaram a digestão do sangue, possivelmente devido a presença de atividade fibrinolítica no intestino médio dos triatomíneos (Hellmann & Hawkins, 1964).

Ainda nesse sentido, é importante mencionarmos a capacidade natural dos eritrócitos de algumas espécies de mamíferos formarem “rolos”, fenômeno esse conhecido por agregação de eritrócitos, podendo alterar, assim, a viscosidade do sangue em condições de baixo deformidade. Essa agregação varia muito entre as espécies de vertebrados, sendo observada em níveis mais elevados no sangue de cavalos seguido pelo sangue de gatos, de humanos e de porcos. Nas hemácias de coelho, camundongo, rato, gado e ovelha foi observada pouca agregação de eritrócitos (Weng *et al.*, 1996; Windberger *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os triatomíneos possuem importância médica por serem transmissores do *Trypanossoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (DC) (Chagas, 1909). Trata-se de ectoparasitos temporários, cujo contato com seus hospedeiros é restrito ao momento do repasto sanguíneo, fonte única de nutrientes para os mesmos. Além disso, é durante a alimentação sanguínea que os tripanossomatídeos circulam entre eles e os hospedeiros vertebrados.

Nos triatomíneos a hematofagia é do tipo solenofagia (Lavoipierre *et al.*, 1959). A maior parte do tempo durante a alimentação é dedicada a sucção do sangue (fase de ingurgitamento) pelo inseto. Durante esse processo, dois locais de interface triatomíneo-hospedeiro fazem-se importantes na modulação do desempenho alimentar do barbeiro: i) a boca funcional do inseto e o endotélio do hospedeiro e ii) o intestino anterior do inseto e o sangue do hospedeiro (Soares *et al.*, 2021).

Como ocorre com a maioria dos ectoparasitas temporários, o tempo de contato dos triatomíneos com seus hospedeiros vertebrados para realizar o repasto sanguíneo é momento um muito perigoso, pois podem ser percebidos ou até mortos pelo hospedeiro (Gillet 1969;

Sant'Anna *et al.*, 2001). Para minimizar esse risco, uma estratégia adequada deve incluir a maximização das taxas de ingestão de nutrientes e a minimização do tempo de contato com o hospedeiro (Lehane, 2005), entretanto, o papel da biomecânica da alimentação sanguínea na determinação das restrições de tal estratégia é muitas vezes negligenciada (Daniel & Kingsolver, 1983).

A partir de estudos dos sinais elétricos produzidos durante a alimentação dos triatomíneos, Smith (1979) mostrou o efeito da viscosidade da dieta nos parâmetros alimentares de *R. prolixus* quando esses insetos se alimentavam de um alimentador artificial. Ele observou que o aumento da viscosidade da dieta (0,8 a 6,5 cP) ocasionou um aumento do tempo de contato (TC) com a fonte alimentar e uma redução da taxa de ingestão (TI) (~ 68%) e do ganho de peso (GP) (~ 33%) em ninfas de quinto estágio ninfal. A redução TI (GP/TC) foi devido à diminuição da frequência (F) (~ 48%) e da quantidade de líquido ingerido por contração da BC (QLC) (~ 38%). Estudos baseados no eletromiograma da bomba cibarial durante a alimentação in vivo dos triatomíneos, mostraram que a taxa de ingestão efetiva (TIE) (que considera o TC menos os períodos de inatividade da BC) é o principal parâmetro de alimentação que afeta o tempo de contato com o hospedeiro. A TIE (F x QLC) entre a espécies de triatomíneos podem variar muito; mesmo quando a espécie hospedeira, o estágio evolutivo e o local do sítio de alimentação é considerado nas comparações. Por exemplo, a TI de ninfas de quinto estágio que se alimentaram na pele do abdome de camundongo variou de 3,5 mg / min para *R. neglectus* a 21,3 mg / min para *T. infestans*, representando uma diferença na TIE de 6,1 vezes (Pereira *et al.*, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2017).

Um estudo recente sobre comportamento alimentar de *R. prolixus* na pele de camundongo baseado tanto no eletromiograma como na microscopia intravital da BC sugeriu que a redução do desempenho alimentar observada ao longo do repasto do inseto pode estar associado, entre outros, a variações momentâneas da viscosidade do sangue no sítio de alimentação dos insetos (Soares *et al.*, 2014). Entretanto, até o momento nenhum estudo comparou em detalhes o perfil dos parâmetros alimentares durante o repasto dos triatomíneos em dieta artificial e em hospedeiro vivo, estabelecendo as semelhanças e as diferenças que podem estar relacionadas a características intrínsecas da fisiologia dos insetos (semelhanças) ou da dieta/fonte alimentar utilizada (diferença).

Outro aspecto relevante, decorre do fato de que embora as bombas biológicas sejam normalmente muito bem caracterizadas anatomicamente e morfológicamente, existem poucos estudos que descrevem o funcionamento da mesma, e especialmente aqueles que fornecem informações sobre o desempenho delas quando em atividade (pressão, fluxo de volume e

frequência de bombeamento) (Esser *et al.*, 2019). Nesse contexto, o presente trabalho, a partir de imagens da bomba cibarial captadas por microscopia intravital, padronizou e validou um método de processamento de imagens e tratamento dos dados obtidos para identificar as fases do ciclo de atividade, bem como, avaliar o desempenho do bombeamento do sangue durante a alimentação de *Rhodnius prolixus* *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, foi possível detalhar o movimento do sangue durante a sua passagem pela da cavidade da bomba cibarial, visando uma melhor compreensão do seu mecanismo de funcionamento.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a atividade da bomba cibarial de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) pelo processamento das imagens captadas durante a alimentação dos insetos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Padronizar uma metodologia de melhoria e análise das imagens obtidas por microscopia intravital da cabeça de *R. prolixus* para o estudo do ciclo de atividade da bomba cibarial ao longo da alimentação dos insetos;
- Validar parâmetros qualitativos dos fenômenos que ocorrem no ciclo de atividade da bomba cibarial para avaliar o desempenho do bombeamento de líquidos durante o repasto do triatomíneo;
- Desenvolver planilhas de cálculo para extrair as informações da análise de imagens e calcular os parâmetros dos ciclos de atividade da bomba cibarial durante o repasto do triatomíneo;
- Comparar o perfil dos parâmetros de atividade da bomba cibarial ao longo da alimentação *R. prolixus* com duas dietas artificiais de viscosidade distinta e na pele de hospedeiro vivo;
- Identificar e caracterizar os problemas apresentados no processo de bombeamento do sangue durante o repasto sanguíneo em hospedeiro vivo por *R. prolixus*;
- Estudar o movimento do sangue dentro da cavidade da bomba cibarial para caracterização do seu mecanismo de funcionamento em *R. prolixus*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material Biológico

#### 4.1.1. *Rhodnius prolixus*

Foram utilizadas ninfas de terceiro e quinto estágio de *Rhodnius prolixus* em jejum de 15 dias após a muda. Os insetos são procedentes da linhagem Honduras, colônia mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia (ICB/ UFMG) desde 1997.

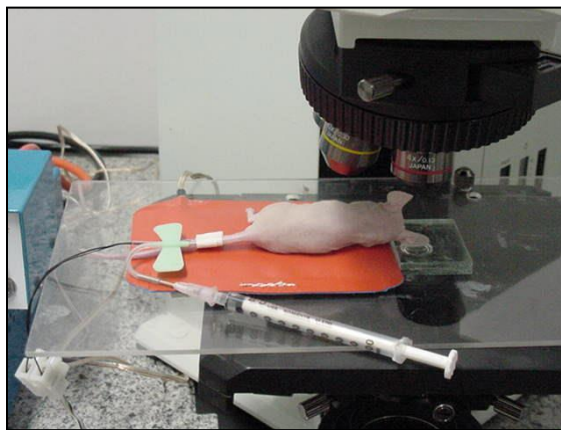
Os triatomíneos foram mantidos no insetário do LFIH em condições controladas (28 °C ± 2°C, 60% ± 10% UR, 12 horas claro/escuro), em potes cilíndricos de acrílico (15 cm de diâmetro e 19 cm de altura) forrados com papel filtro e tampados com tecido voal. Com vistas a aumentar a superfície interna dos potes, uma sanfona de cartolina com altura de 19cm foi adicionada aos mesmos. Os insetos foram alimentados semanalmente em *Mus musculus* anestesiados com Ketamina (150 mg/Kg de peso vivo) e Xilazina (10 mg/Kg de peso vivo) em concordância com o Conselho de Ética no Uso de Animais da UFMG (n. 16/2017).

#### 4.1.2. Hospedeiro mamífero

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*/Linhagem *hairless* (30 a 40 dias de vida, ~ 20 gramas) criados no biotério do Departamento de Parasitologia (ICB/ UFMG) mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum*. Justifica-se a escolha destes animais considerando a possibilidade de visualização, *in vivo*, na orelha dos mesmos, da microcirculação cutânea de forma clara, detalhada e não invasiva. A orelha de um camundongo *hairless* jovem mede aproximadamente 13 mm, tanto em largura quanto em comprimento, com espessura aproximada de 300 µm. Além disso, na base da orelha origina-se uma rede vascular local, a partir de três pares primários de arteríolas e vênulas, as quais sofrem mais três subdivisões originando os vasos de segunda, terceira e quarta ordens que vão em direção à periferia da orelha (Soares *et al.*, 2006).

#### 4.2. Análise da atividade da bomba cibarial durante a hematofagia de *Rhodnius prolixus* em hospedeiro mamífero

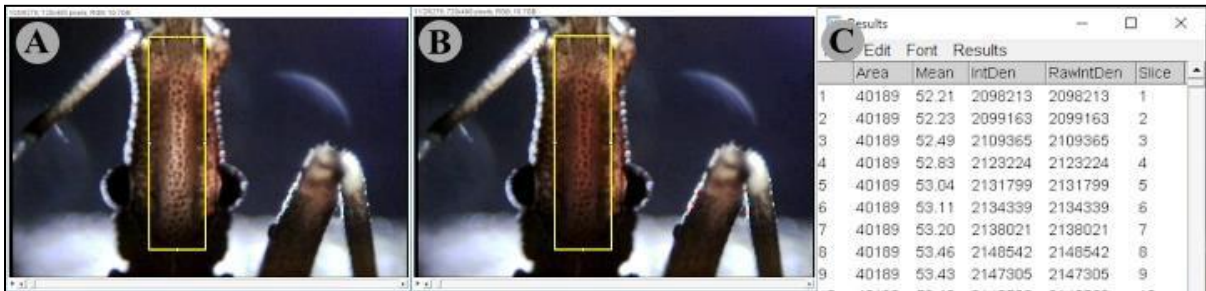
O camundongo anestesiado foi mantido em decúbito lateral, sobre uma manta térmica (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá) mantida a 37 °C, sendo a temperatura corporal do camundongo continuamente monitorada por um sensor introduzido no reto do animal. Após a anestesia, a veia da cauda do camundongo anestesiado foi canulada para administração dos reagentes durante os experimentos. A superfície interna da orelha foi delicadamente esticada e fixada, com fita adesiva dupla face, sobre uma pequena placa de acrílico posicionada sobre a plataforma do microscópio intravital (Fig. 5A). Por sua vez, com vistas a imobilizar os insetos mantendo-os sob o campo de observação do microscópio, 24 horas antes dos experimentos, os insetos foram fixados pelo tórax em papel cartolina com auxílio de fita dupla face (Fig. 5B). Os experimentos foram iniciados 30 minutos após o manuseio da orelha, com vistas a permitir a estabilização da temperatura e da microcirculação da região. Para observação da alimentação dos insetos e, por consequência do funcionamento da bomba cibarial, foi utilizado microscópio de epifluorescência (Olympus BX50, Tóquio, Japão) ou um estéreomicroscópio (Wild Heerbrug M5-89797, Suíça). As imagens foram registradas (29 frames/segundo) com uma câmera (Olympus BX50) conectada a um gravador de DVD (LG DR175B), acoplada ao microscópio (ocular de 4X e objetivas de 4 ou 10X).



**Figura 5.** Preparação do camundongo *hairless* para ensaios de microscopia intravital (Fonte: Soares, 2004 com modificações).

As imagens foram analisadas através do software Fiji Image J versão 1.52i (*National Institutes of Health*). A bomba cibarial de *R. prolixus* está localizada entre a região pós-ocelo até base das antenas sendo facilmente detectada pela coloração mais escura da sua parede, formando duas listas transversais na cabeça do inseto (Fig. 2A-B). Para as análises, a região

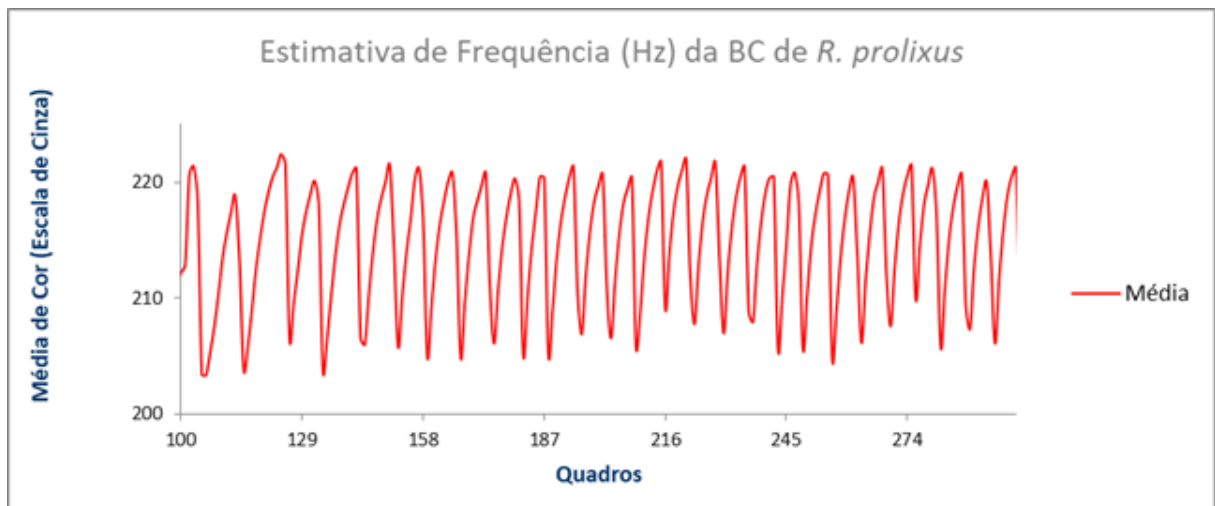
da bomba cibarial foi selecionada com uma “máscara retangular” e cada pixel desta área foi quantificado pela atribuição de um valor de cor em uma escala de cinza [variando de 0 (cor preta) até 255 (cor branca)]. A curva da variação de cor da bomba cibarial em funcionamento foi obtida pela análise sequencial das imagens (quadro a quadro) com o recurso “Measure Stack” dos vídeos gravados durante os experimentos de alimentação dos insetos (Fig. 2C). Uma vez que quando cheia de sangue a bomba cibarial apresenta uma coloração mais escura (2B) do que quando vazia (2A) os dados obtidos em cor média em média inversa foram



transformados através da fórmula “média inversa= 255 - valor da média”.

**Figura 6.** Cabeça de *Rhodnius prolixus* com destaque para uma “máscara” (retângulo em amarelo) que delimita a região da bomba cibarial a ser analisada pelo software Image J. A) Bomba cibarial vazia; B) Bomba cibarial cheia; C) Dados gerados pelo software.

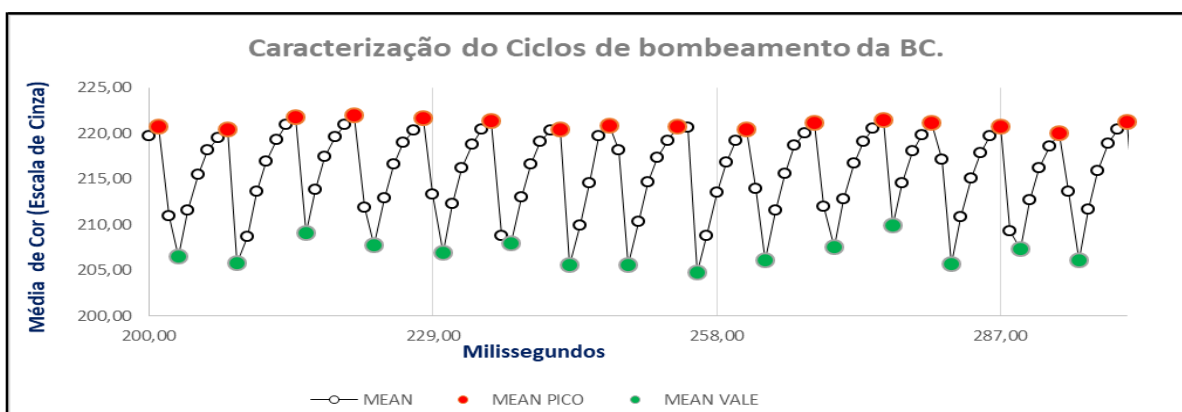
Posteriormente, os dados gerados foram transferidos para o Excel (Microsoft Office 365) sendo confeccionadas as curvas de variação de cor da bomba cibarial ao longo do tempo (Fig. 7).



**Figura 7:** Curva típica da variação de cor apresentada pela região da bomba cibarial obtida de uma ninfa de 3ºestádio de *Rhodnius prolixus* durante o repasto sanguíneo na pele de camundongo *hairless*. Neste exemplo o experimento de alimentação foi gravado à 29 qps, ou seja, 29 quadros correspondem a um período de 1 segundo.

### 4.3. Detecção de picos e vales da curva de variação de cor da bomba cibarial em funcionamento de *Rhodnius prolixus*

A curva da variação da cor apresentada pela bomba cibarial ao longo do repasto dos insetos apresenta um perfil semelhante a um movimento periódico, composto de uma sucessão de picos e vales, que estão relacionados com o ciclo de enchimento e de esvaziamento da bomba. Assim, a partir dos dados da média invertida da cor da bomba cibarial e o tempo em milissegundos [milissegundos (ms) = (1000/qps) x número do quadro)] foi desenvolvida uma planilha de cálculo para a identificação dos picos (círculos vermelhos) e dos vales (círculos verdes) utilizando a função SE do Excel. O princípio utilizado na detecção dos picos e vales foi reconhecer numa sequência crescente de números aquele de maior valor (pico) e, numa sequência decrescente, o de menor valor (vale). Foram consideradas sequências de número com tamanho de 2 a 6, sendo ajustadas de forma que a planilha de cálculo detectasse “automaticamente” o maior número de picos/vale na posição correta na curva de interesse (Fig. 8). Antes de utilizar os tempos correspondente aos picos e vales [milissegundos (ms) = (1000/qps) x número do quadro)] para o cálculo do tempo de enchimento e de esvaziamento da BC, todas as marcações “automáticas” foram revisadas e corrigidas manualmente, retirando-se os picos/vales posicionados em local incorreto e/ou acrescentando-se os picos/vales que não foram marcados/identificados automaticamente pela planilha de cálculo.



**Figura 8.** Exemplo de uma curva da média de cor (linha e círculos pretos) da bomba cibarial de uma ninfa de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* durante a alimentação em camundongo *hairless*, gerada pela planilha de cálculo desenvolvida para a identificação dos picos (círculos vermelhos) e vales (círculos verdes). Para a detecção dos picos e vales foram utilizadas fórmulas baseadas em três tamanhos de sequência de números: Dois números (n1, n2 <n3> n4, n5), quatro (n1, n2, n3, n4<n5>n6, n7, n8, n9) ou seis números (n1, n2, n3, n4, n5n6,<n7>n8, n9, n10, n11, n12, n13).

Essa planilha de cálculo permitiu identificar quase a totalidade dos ciclos de atividades da bomba cibarial presentes nas imagens gravadas nos experimentos de alimentação. A partir dessa ferramenta, foi possível introduzir, durante o desenvolvimento do presente trabalho, novos parâmetros para o estudo da atividade da bomba cibarial ao longo da alimentação de *R. prolixus*. As etapas desse processo estão descritas na seção de resultados da dissertação.

#### **4.4. Análise da atividade da bomba cibarial durante a hematofagia de *Rhodnius prolixus* *in vitro* frente a dietas com diferentes viscosidades**

Foram utilizadas duas soluções: uma de Locke-Ringer (154mM NaCl; 5,5mM KCl; 2,2mM CaCl; 5,0mM HEPES; 5,0mM glicose) e outra solução constituída de salina 0,9%; 0,23g/ml Dextran (35- 45kDa). Justifica-se o uso do Dextran, pois além de ser atóxico, o mesmo é capaz de aumentar a viscosidade de uma solução mesmo em baixa concentração. A estas duas soluções foram acrescentadas ATP ( $10^{-3}$ M) como fagoestimulante e Azul de Evans (0,25g/ml) para facilitar a visualização das soluções durante o repasto dos insetos. Essas soluções foram oferecidas aos insetos em alimentador artificial de vidro acoplado a um circulador de água termostatizado permitindo a manutenção da temperatura da dieta artificial à 37 °C ( $\pm 1$  °C) durante os experimentos. Como membrana artificial foi utilizada luva de látex utilizada em laboratório. A medida da viscosidade das soluções foi realizada no Laboratório de Reologia do CETEC/MG em colaboração com o Dr. Antônio Valadão Cardoso.

Durante os experimentos de alimentação, a cabeça dos insetos foi iluminada lateralmente com luz fria, permanecendo sob campo visual de uma lupa acoplada a câmera digital (Cassio FH20). Trechos da alimentação foram gravados à 210 qps. Para melhorar a visualização da passagem da dieta pela cavidade da bomba cibarial, bem como suavizar os ruídos, as imagens gravadas em RGB foram filtradas utilizando a ferramenta “Kalman filter” seguido de um tratamento no contraste com “Math – Gama (2.5)”. Em seguida, as imagens foram transformadas em 8bits (preto e branco) com o recurso “Split Channels”, obtendo-se, assim, três sequências de imagens (“verde, azul e vermelho”), sendo a vermelha, utilizada na maioria das vezes.

#### 4.5. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 7.0 para Windows. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para observar as correlações estatísticas de variáveis que não apresentarem distribuição normal. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão do total de experimentos.

### 5. RESULTADOS

No presente estudo desenvolvemos uma metodologia de análise das imagens obtidas nos experimentos de microscopia intravital que registram em vídeo a região da bomba cibarial (BC) na cabeça dos insetos durante a alimentação *in vitro* (diferentes dietas) e *in vivo* (camundongo *hairless*).

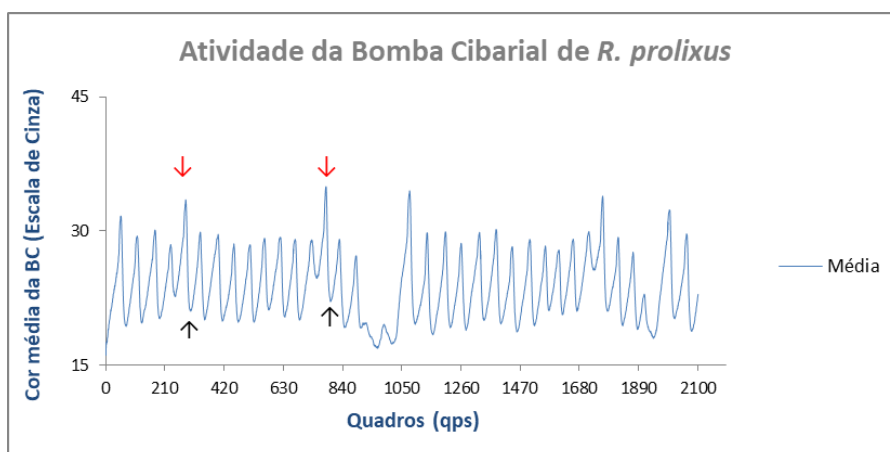
#### 5.1. Alimentação *in vitro*

O primeiro aspecto avaliado foi o perfil da atividade de bombeamento durante a fase de ingurgitamento em dois grupos de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentados com dietas artificiais com viscosidades distintas – solução de Locke (n=3) e Dextran (n=3) (Tab.1). Os insetos alimentados em solução de Locke (0,78/mPa a 60rpm) apresentaram média maior de taxa de ingestão, maior de ganho de peso e menor duração do tempo de alimentação em relação aos insetos alimentados em solução de Dextran 0,23g/ml (6,9 mPa a 60rpm) (Teste t;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Parâmetros alimentares de ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* alimentados em duas dietas artificiais com viscosidade diferente: solução de Locke (LCK, n=3) com viscosidade de 0,78 mPa e solução de Dextran 0,23g/ml (D23, n=3) com viscosidade de 6,9 mPa (teste T,  $p < 0,05$ ).

Experimento (Nº de Vídeos)	Peso Inicial (mg)	Peso Final (mg)	Ganho de Peso/mg	Peso final/Peso inicial	Taxa de Ingestão(mg/min)	Duração da Alimentação (min)
3LCK (12)	79,00	320,00	241,00	4,05	15,80	15,25
5LCK (8)	88,00	371,00	283,00	4,22	19,63	14,42
6LCK (11)	75,00	370,00	295,00	4,93	16,02	18,42
<b>Média locke</b>	<b>80,67 <math>\pm</math>6,66</b>	<b>353,67 <math>\pm</math>29,16*</b>	<b>273,00 <math>\pm</math>28,35*</b>	<b>4,40 <math>\pm</math>0,47 *</b>	<b>17,15 <math>\pm</math>2,15*</b>	<b>16,03 <math>\pm</math>2,11*</b>
1D23(14)	73,00	182,00	109,00	2,49	2,39	45,67
2D23 (10)	72,00	141,00	69,00	1,96	2,24	30,83
3D23 (14)	77,00	173,00	96,00	2,25	2,28	43,50
<b>Média Dextran</b>	<b>74,00 <math>\pm</math>2,65</b>	<b>165,33 <math>\pm</math>21,55</b>	<b>91,33 <math>\pm</math>20,40</b>	<b>2,23 <math>\pm</math>0,27</b>	<b>2,30 <math>\pm</math>0,08</b>	<b>40,00 <math>\pm</math>8,02</b>

Para estimar a frequência de bombeamento dos insetos utilizou-se a representação gráfica da variação da cor da BC observada ao longo da alimentação dos insetos (Fig. 9). A curva do valor médio da cor da BC quando em atividade assemelhou-se ao de um movimento periódico, apresentando sucessivos picos e vales (Fig. 10). Assim, a frequência foi obtida pelo número de picos observados em intervalos correspondentes a um segundo.

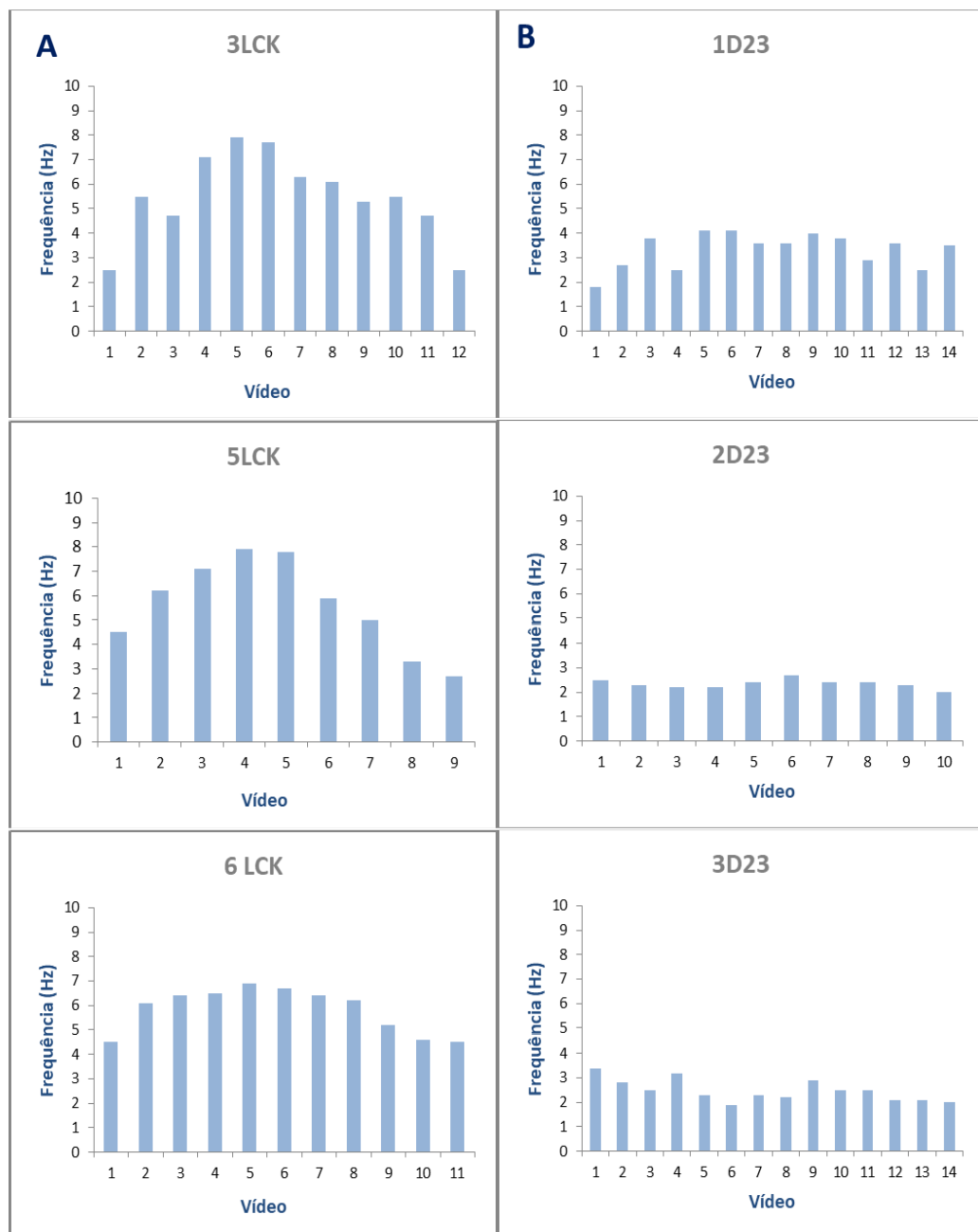


**Figura 9.** Variação média da cor em escala de cinza (0-255) apresentada pela bomba cibarial durante um período de 10 segundos da alimentação artificial de uma ninfa de 3º estágio de *Rhodnius prolixus*. Neste exemplo a frequência estimada foi de 3,6 Hz (36 picos/10 segundos). As setas vermelhas indicam os picos e as setas pretas os vales.

Uma vez que cada experimento/inseto de alimentação foi registrado em mais de um vídeo (Tab. 1), para obtenção do perfil da frequência ao longo da alimentação, foram analisados os 10 primeiros segundos de todos os vídeos de cada experimento/inseto. A partir dessas análises, calculamos para os dois grupos experimentais: a frequência média geral e a média de cada trecho/período da alimentação dos insetos. A média geral da F (Hz) dos insetos alimentados com a solução de Locke ( $5,6 \pm 1,5$ ) foi maior do que a observada frente ao Dextran ( $2,8 \pm 0,8$ ) (Teste t,  $p < 0,05$ ). Considerando que a taxa de ingestão dos insetos pode ser estimada pela frequência média de bombeamento multiplicada pela quantidade média de líquido ingerida por contração BC (QLC), o fato dos insetos alimentados com Locke terem apresentado aproximadamente o dobro da frequência dos alimentados com Dextran, explica, em parte (~50%), a taxa de ingestão de ~7,5 vezes maior observada neste grupo experimental (17,2 mg/min) em relação aos alimentados na solução mais viscosa (2,3 mg/min) (Tab. 1).

Além de apresentar uma maior média geral da frequência, os insetos alimentados com Locke (solução menos viscosa) exibiram um perfil de frequência média ao longo da

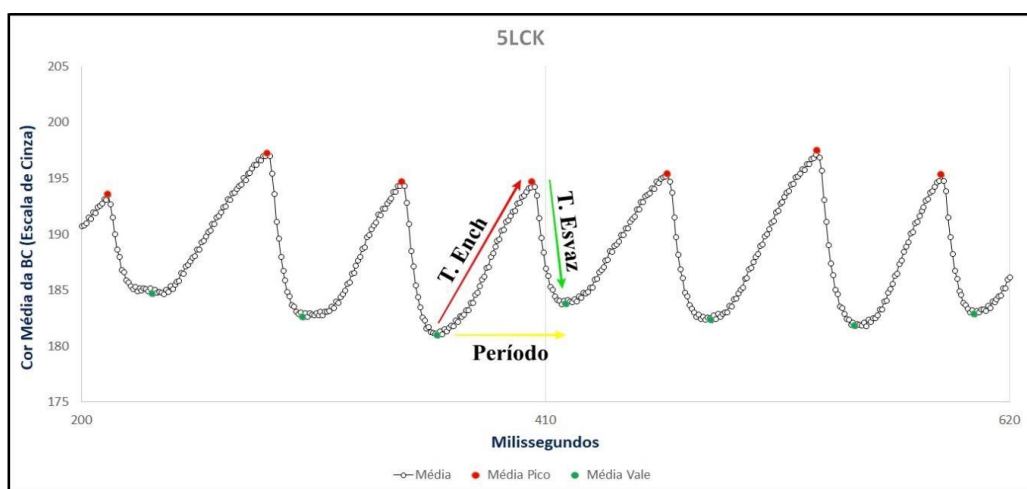
alimentação distinta em relação aos alimentados com Dextran (Fig. 10). Nos insetos que receberam Locke, a frequência inicial (primeiro vídeo) e a frequência final (último vídeo) foram menores do que a frequência observada no meio da alimentação (vídeo médio ou o valor médio dos dois medianos quando o total de vídeos foi ímpar) (Test t,  $p < 0,05$ ). Diferentemente, nos insetos alimentados com Dextran não houve diferença no valor na frequência nos trechos de interesse durante a alimentação (início - I, meio/mediano - M e fim - F), sendo semelhante em todo o período.



**Figura 10.** Valores de frequência (Hz) observados nos diferentes trechos/vídeos dos experimentos de alimentação artificial sendo A- solução de Locke (LCK) e B - solução de Dextran (D23).

### 5.1.1. Caracterização dos ciclos de atividade da bomba cibarial de *R. prolixus*

Para a determinação do tempo de enchimento, do tempo de esvaziamento e da duração de cada ciclo de atividade da BC utilizamos uma planilha de cálculo com a função SE do programa Office Excel. Ela permitiu detectar os picos e os vales nas curvas da média de cor apresentada pela BC obtidas a partir das imagens registradas durante a alimentação dos triatomíneos. A planilha de cálculo foi desenvolvida para ser abastecida com os dados da curva a ser analisada (quadro/segundo - qps e valores da cor), gerando, assim, os vales (círculos verdes) e picos (círculos vermelhos) identificados (Fig. 11) por ordem de seu aparecimento (quadro ou “frame”). O princípio utilizado na detecção dos picos e vales foi reconhecer numa sequência crescente de números aquele de maior valor (pico) e numa sequência decrescente o de menor valor (vale). O tamanho da sequência de números que foram considerados para esta detecção variou de 2 a 6. O tamanho da sequência de número utilizado na fórmula foi ajustado para que a planilha de cálculo detectasse “automaticamente” o maior número de picos/vale na posição correta na curva de interesse. Antes de utilizar os tempos correspondente aos picos e vales [milissegundos (ms) =  $(1000/\text{qps}) \times \text{número do quadro}$ ] para o cálculo do tempo de enchimento e de esvaziamento da BC, todas as marcações “automáticas” foram revisadas e corrigidas manualmente, retirando-se os picos/vales posicionados em local incorreto e/ou acrescentando-se os picos/vales que não foram marcados/identificados automaticamente pela planilha de cálculo.



**Figura 11.** Exemplo de uma curva da média de cor (linha e círculos pretos) da bomba cibarial obtida de uma ninfa de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* durante a alimentação gerada pela planilha de cálculo desenvolvida para a identificação dos picos (círculos vermelhos) e vales (círculos verdes). A listagem da ordem e do momento (ms) de aparecimento de cada pico e de cada vale possibilitou o cálculo dos seguintes parâmetros da atividade da bomba cibarial: a) o período(ms) de cada ciclo: duração de tempo (ms) entre dois vales consecutivos (setas

amarelas); b) o tempo de enchimento (T. Ench): duração de tempo (ms) entre um pico e o vale anterior (seta vermelhas); c) o tempo de esvaziamento (T. Esvaz): duração de tempo (ms) entre um pico e o vale posterior (seta verdes); d) frequência instantânea (Hz):  $1000/\text{Período (ms)}$ ; e) tempo relativo de enchimento (%):  $(\text{tempo de enchimento}/\text{período}) \times 100$ ; f) tempo relativo de esvaziamento (%):  $(\text{tempo de esvaziamento}/\text{período}) \times 100$ ; g) Velocidade de enchimento (Vel. Ench -  $\Delta \text{ cor/ms}$ ): diferença de cor entre um o pico e o vale anterior/ tempo de enchimento; h) Velocidade de esvaziamento (Vel. Esvaz -  $|\Delta \text{ cor}|/\text{ms}$ ): diferença de cor entre um o pico e o vale posterior/ tempo de esvaziamento.

A identificação dos picos e dos vales permitiu introduzir na análise do ciclo de atividade da BC durante a ingestão de líquidos outros parâmetros além da frequência (Fig. 11). Assim, para avaliar o efeito da viscosidade na atividade da BC, foram selecionados três trechos/vídeos (início - I, meio/mediano - M e fim - F) da alimentação de todos os experimentos dos dois grupos experimentais apresentados na Tabela 1.

A comparação dos parâmetros da atividade da BC nos três momentos avaliados (I, M, F) confirma a diferença no perfil de frequência apresentado pelos triatomíneos durante o repasto com a solução de Locke (menos viscosa) ou com o Dextran (mais viscosa) (Tab. 2). Os insetos alimentados com Locke apresentaram uma frequência média maior no meio do repasto (6,7 - 8,0 Hz) quando comparado ao início (2,5 - 4,7 Hz) e ao fim (3,5 - 4,7 Hz). Diferentemente, nos insetos alimentados com Dextran a frequência média no meio (2,3 - 3,6 Hz) foi semelhante à do início (1,9 - 3,4 Hz) e a do fim (1,9 - 3,8 Hz) do repasto em 67% (2/3) e 33% (1/3) dos experimentos, respectivamente (Tab. 2).

O perfil observado para a frequência, pensando nos dois grupos experimentais (alimentados com Locke ou Dextran), se manteve em relação aos tempos de enchimento, de esvaziamento e de duração do ciclo (período) da BC. Considerando que a frequência é o inverso do período do ciclo da BC, como o esperado, o período médio nos insetos alimentados com a solução de Locke foi menor no meio quando comparado ao início e fim do repasto, padrão esse, também observado nos tempos de enchimento e de esvaziamento da BC. Por sua vez, nos insetos alimentados com o Dextran, estes três tempos não apresentaram um padrão definido, sendo ora um determinado parâmetro menor e, em outro, maior (Tab. 2).

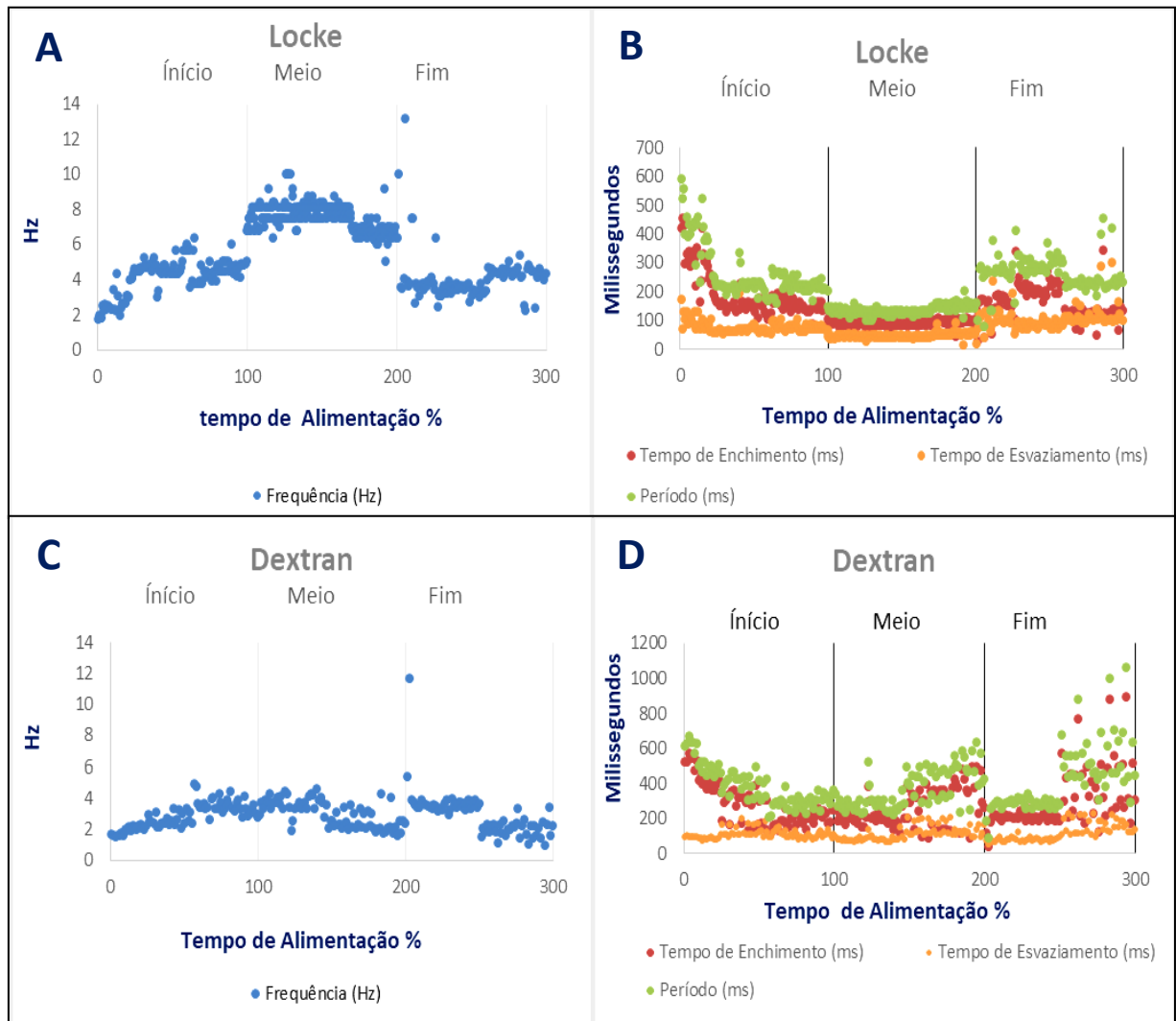
O interessante é que quando comparamos, entre os dois grupos experimentais, a média geral da frequência, o período, o tempo de enchimento da BC e o tempo de esvaziamento do ciclo da BC, nos três trechos da alimentação (I, M, F), só encontramos diferença no meio, sendo a frequência maior e o período, o tempo de enchimento e o tempo de esvaziamento menores nos insetos alimentados com Locke, quando comparados ao do Dextran (Test t,  $p < 0,05$ ). Ou seja, os insetos alimentados com uma solução de alta viscosidade não foram

capazes de após um início de menor eficiência da BC, aumentar a frequência de bombeamento, como observado nos insetos alimentados com solução de menor viscosidade.

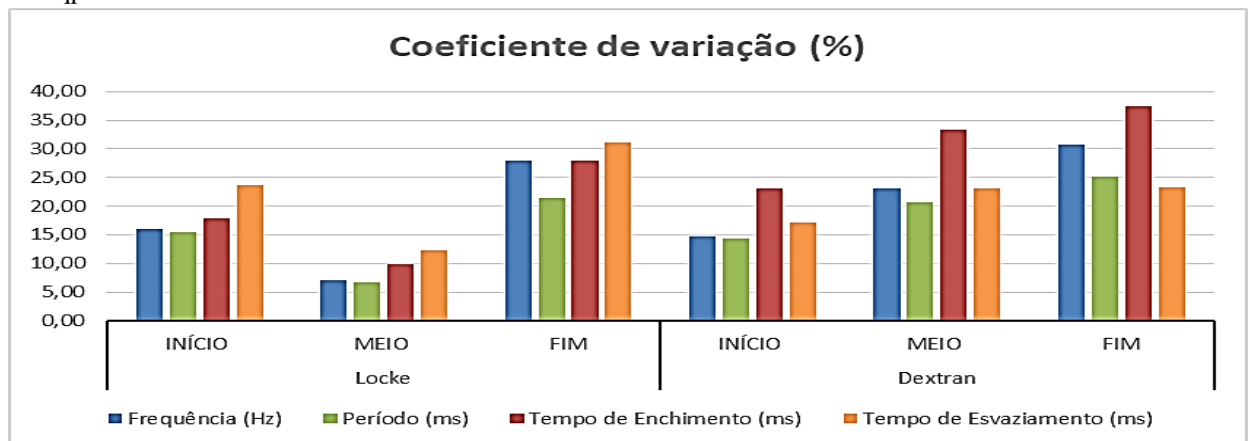
**Tabela 2.** Parâmetros da atividade da bomba cibarial de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* alimentadas artificialmente com solução de Locke (LCK, n=3) ou Dextran (D23, n=3) no início (I), no meio (M) e no fim (F) da alimentação. Cada trecho representa a análise de 10 segundos de imagens provenientes de experimentos de microscopia intravital da cabeça dos insetos registradas a 210 qps .

Parâmetros	Experimento - Vídeos Momento	3 LCK - 1,6,12 Média - DP	5 LCK - 1,4,8 Média - DP	6 LCK - 1,6,11 Média - DP	Locke Média Geral	1 D23 -1,7,14 Média - DP	2D23 - 1,5,10 Média - DP	3D23 1,7,14 Média - DP	Dextran Média Geral
Frequência (Hz)	I	2,54 ±0,58	4,66 ±0,59	4,54 ±0,59	3,91 ±0,97	1,9 ±0,26	2,59 ±0,39	3,54 ±0,54	2,68 ±0,82
	M	7,77 ±0,75	7,96 ±0,32	6,73 ±0,50	7,49 ±0,54	3,64 ±0,55	2,54 ±0,51	2,28 ±0,79	2,82 ±0,72
	F	4,69 ±2,43	3,45 ±0,60	4,27 ±0,61	4,14 ±0,51	3,83 ±1,40	2,06 ±0,47	1,93 ±0,63	2,61 ±1,06
		M>F>I	M>I>F	M>I>F		F≈M>I	I≈M>F	I>M≈F	
Período(ms)	I	410,52 ±84,50	218,10 ±29,71	223,92 ±27,68	284,18 ±89,37	537,30 ±76,63	394,10 ±55,52	288,04 ±41,83	406,48 ±125,09
	M	129,84 ±11,51	125,82 ±5,06	149,35 ±10,94	135,00 ±19,28	282,31 ±55,49	407,34 ±74,01	473,81 ±54,10	387,82 ±97,23
	F	246,1 ±70,61	295,67 ±39,26	241,79 ±54,33	261,19 ±24,45	274,87 ±41,13	511,28 ±124,72*	578,99 ±208,89	455,05 ±159,67
		I>F>M	F>I>M	F>I>M		I>M≈F	F>M≈I	F>M>I	
Tempo de Enchimento(ms)	I	312,5 ±70,03	149,84 ±22,72	147,18 ±27,74	203,17 ±94,69	449,47 ±69,72	266,10 ±80,69	183,61 ±43,49	299,73 ±136,08
	M	86,92 ±10,53	84,49 ±4,76	96,61 ±11,57	89,24 ±6,41	200,00 ±46,73	262,30 ±107,46	350,89 ±126,12	271,06 ±75,83
	F	140,38 ±46,60	213,13 ±36,05	123,33 ±41,33	81,00 ±15,34	197,75 ±35,97	358,40 ±156,14	424,09 ±213,29	326,75 ±166,44
		I>F>M	F>I>M	I>F>M		I>M≈F	F>I≈M	F≈M>I	
Tempo de Esvaziamento(ms)	I	98,02 ±25,51	68,25 ±20,61	76,74 ±11,05	81,00 ±15,34	87,93 ±8,04	128,00 ±31,33	104,62 ±18,40	106,85 ±20,13
	M	42,92 ±4,66	41,33 ±3,56	52,74 ±9,09	45,66 ±6,18	82,31 ±18,39	145,04 ±39,69	122,92 ±23,79	116,76 ±31,82
	F	105,71 ±43,69	82,54 ±12,18	118,45 ±43,96	102,23 ±18,21	77,12 ±13,31	152,88 ±50,07	154,90 ±30,77	128,30 ±44,33
		F≈I>M	F>I>M	F>I>M		I≈M>F	F>M>I	F>M>I	

Os gráficos das figuras 12 e 13 mostram os dados brutos dos parâmetros da atividade da BC obtidos dos insetos dos dois grupos experimentais (alimentados com Locke ou com Dextran) durante os três trechos do repasto avaliados (I, M, F). Nos insetos alimentados com Locke, comparando o meio do repasto com o início, percebe-se diferença nos indicadores de frequência e nos tempos do ciclo, tanto nos valores quanto na dispersão dos mesmos (mensurada pelo coeficiente de variação) (Fig. 12A-B e 13). Isso não foi observado nos insetos alimentados com Dextran. Ressalta-se que no final da alimentação, de maneira geral, os insetos dos dois grupos experimentais voltam a apresentar valores médios (frequência, tempos do período, tempo de enchimento e tempo de esvaziamento) e padrão de dispersão semelhantes (Figs. 12C-D e 13).



**Figura 12.** Valores brutos dos parâmetros da atividade da bomba cibarial de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* alimentadas artificialmente com solução de Locke (A e B, n=3): ou Dextran (C e D, n=3) obtidos no início (I – 0-100%), no meio (M – 100-200%) e no fim (F – 200-300%). Cada trecho representa a análise de 10 segundos de imagens provenientes de experimentos de microscopia intravital da cabeça dos insetos captadas a 210 qps.



**Figura 13.** Coeficiente de variação (%) dos parâmetros médios gerais da atividade da bomba cibarial apresentados na Tabela 2.

## 5.2. Alimentação *in vivo*

Após a padronização da análise de imagem para avaliar o ciclo de atividade da BC em insetos alimentados com dietas artificiais, a próxima etapa foi aplicá-la em insetos que se alimentaram em hospedeiro vivo. Assim foram utilizadas imagens registradas durante todo o repasto de ninfas de 3º estágio de *R. prolixus* (n=5) alimentadas em vênulas (40–47 µm de diâmetro) da microcirculação da pele da orelha de camundongo *hairless*. Nesses experimentos, diferentemente dos realizados em alimentador artificial nos quais a alimentação foi registrada em vários pequenos vídeos, a alimentação (ou seja, todo o repasto sanguíneo) foi registrada em um único vídeo por triatomíneo.

Utilizando a planilha de cálculo para picos e vales foi possível identificar quase 100% dos ciclos de atividade da BC, à exceção dos momentos de movimentação dos insetos, nos quais foi necessário reposicionar a seleção (máscara) para demarcar a região da bomba. Se considerarmos esses momentos, os períodos de sondagem e os períodos de interrupção (no qual a ingestão de sangue foi interrompida), o tempo avaliado representou 95,6 - 100% do tempo total de alimentação (aquele no qual o inseto permaneceu com as peças bucais na pele do hospedeiro = tempo de contato). O tempo de contato, desde a picada até que o momento no qual os triatomíneos retiraram espontaneamente as peças bucais do hospedeiro variou de 37,8 a 46,7 minutos, sendo detectados neste período um total de 1249 a 2890 ciclos da BC (Tab. 3).

**Tabela 3.** Dados gerais dos experimentos de alimentação de ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* (n=5) alimentadas na pele da orelha de camundongo *hairless*, sendo informado o tempo total de alimentação (min), o tempo de interrupções (min) e o número de ciclos da bomba cibarial.

Experimento	Duração do Vídeo Avaliado		Interrupções		Nº de Ciclos de Bombeamento da BC
	Total(min)	Avaliado (%)	Nº de Interrupções	Duração (min)	
Nº 3	4,48	98,06	2	0,09	1249
Nº 5	17,80	100,00	0	0,00	2373
Nº 6	14,65	99,45	1	0,08	1980
Nº 7	46,69	95,63	6	2,04	3726
Nº 8	20,13	98,43	4	0,32	2890

Nesses experimentos, além dos parâmetros da atividade da BC utilizados nos experimentos realizados em alimentador artificial, avaliamos também os tempos relativos e as velocidades de enchimento e de esvaziamento (Tab. 4). De maneira geral, a comparação dos

cinco experimentos revelou diferença em todos os parâmetros avaliados, com grande variação dos valores, exceto nos tempos relativos de enchimento (72,6 a 81,8 %) e de esvaziamento (18,2 a 27,4).

Realizamos um ranqueamento dos experimentos (do mais ao menos eficiente) a partir dos valores da frequência e das velocidades de enchimento e de esvaziamento em ordem decrescente (do mais ao menos eficiente), e dos tempos de enchimento e de esvaziamento em ordem decrescente (do mais ao menos eficiente), considerando todos com igual peso. A colocação final foi realizada considerando a ordem decrescente da soma das posições obtidas nos cinco parâmetros. Dessa forma, obteve-se a seguinte ordem/colocação dos experimentos: n 3 (5 pontos), n 5 e n 8 (15 pontos), n 6 (16 pontos) e n 7 (21 pontos). Ressalta-se que o experimento de n 3 ficou mais bem colocado em todos os 5 parâmetros. Os experimentos de n 5, n 6 e n 7 ficaram em posição intermediária, pontuação final semelhante. Por sua vez, o experimento de n 7 foi o mais mal colocado em todos os parâmetros avaliados, à exceção do tempo de esvaziamento no qual ficou em segundo lugar. Considerando que esse ranqueamento refletiu o tempo total de alimentação dos insetos em ordem decrescente (3-6-5-8-7), ele tem o potencial de ser utilizado para comparar o despenho alimentar dos insetos.

**Tabela 4.** Comparação dos parâmetros da atividade da bomba cibarial apresentada por ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* (n=5) durante o repasto sanguíneo na pele da orelha de camundongo *hairless*.

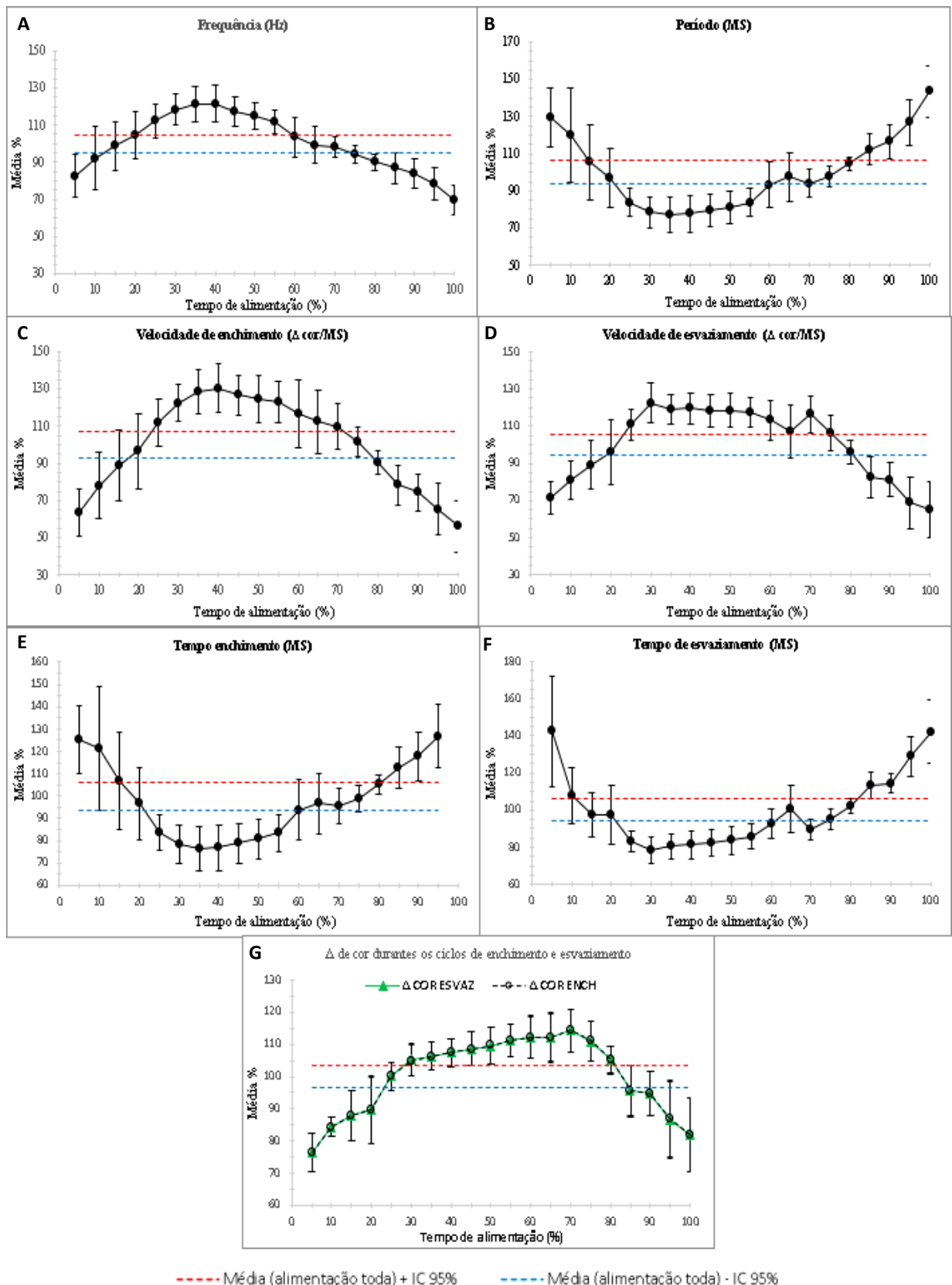
Parâmetros / Experimentos		Nº3	Nº5	Nº6	Nº7	Nº8
Frequência (Hz)	Média ± DP	4,80 ± 0,53	2,32 ± 0,43	2,56 ± 0,82	1,79 ± 0,74	2,84 ± 0,96
	Range	57,14 - 85,72	0,97 - 5,80	0,19 - 7,25	0,36 - 5,80	0,09 - 5,80
	Estatística			3>8>6>5>7		
Período (ms)	Média ± DP	210,87 ± 22,75	445,02 ± 80,39	443,26 ± 195,32	713,39 ± 416,00	412,37 ± 287,65
	Range	137,93 - 379,31	172,41 - 1034,48	137,93 - 5310,34	172,41 - 2758,62	172,41 - 11275,86
	Estatística			7>5≈6>8>3		
Tempo de Enchimento (ms)	Média ± DP	153,1 ± 22,2	367,1 ± 85,1	352,6 ± 129,0	616,4 ± 403,9	328,0 ± 162,5
	Range	103,4 - 310,3	69,0 - 931,0	69,0 - 1069,0	103,4 - 2689,7	137,9 - 3034,5
	Estatística			7>5>6>8>3		
Tempo de Esvaziamento (ms)	Média ± DP	57,78 ± 16,21	77,93 ± 23,23	90,61 ± 119,92	96,96 ± 51,09	84,38 ± 230,38
	Range	34,48 - 103,45	34,48 - 241,38	34,48 - 5000,00	34,48 - 413,79	34,48 - 11068,97
	Estatística			7>6>8≈5>3		
Tempo Relativo de Enchimento (%)	Média ± DP	72,60 ± 7,45	81,79 ± 7,11	80,10 ± 6,07	84,01 ± 8,59	79,54 ± 7,22
	Range	58,14 - 85,71	40,00 - 95,24	5,84 - 94,12	37,50 - 97,50	1,83 - 97,18
	Estatística			7>5>6>8>3		
Tempo Relativo de Esvaziamento (%)	Média ± DP	27,40 ± 7,45	18,21 ± 7,11	19,90 ± 6,07	15,99 ± 8,59	20,46 ± 7,22
	Range	14,29 - 42,86	4,76 - 60,00	5,88 - 94,16	2,50 - 62,50	2,82 - 98,17
	Estatística			3>8>6>5>7		
Velocidade média de Enchimento	Média ± DP	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02
	Range	0,06 - 0,19	0,01 - 0,11	0,01 - 0,13	0,00 - 0,12	0,00 - 0,10
	Estatística			3>5>6>8>7		
Velocidade média de Esvaziamento	Média ± DP	0,32 ± 0,12	0,28 ± 0,09	0,22 ± 0,12	0,29 ± 0,17	0,20 ± 0,08
	Range	0,14 - 0,61	0,02 - 0,71	0,00 - 0,54	0,00 - 0,88	00,00 - 0,50
	Estatística			3>7>5>6>8		

Para avaliar a variação dos parâmetros do ciclo da BC ao longo do repasto sanguíneo, o tempo de alimentação de cada experimento foi dividido em trechos de 5%. Para cada trecho,

foi calculada a média dos valores dos parâmetros (porcentagem) em relação ao valor da média considerando todo o experimento. Por fim, calculamos a média geral dos cinco experimentos em cada trecho de 5% (Fig. 14).

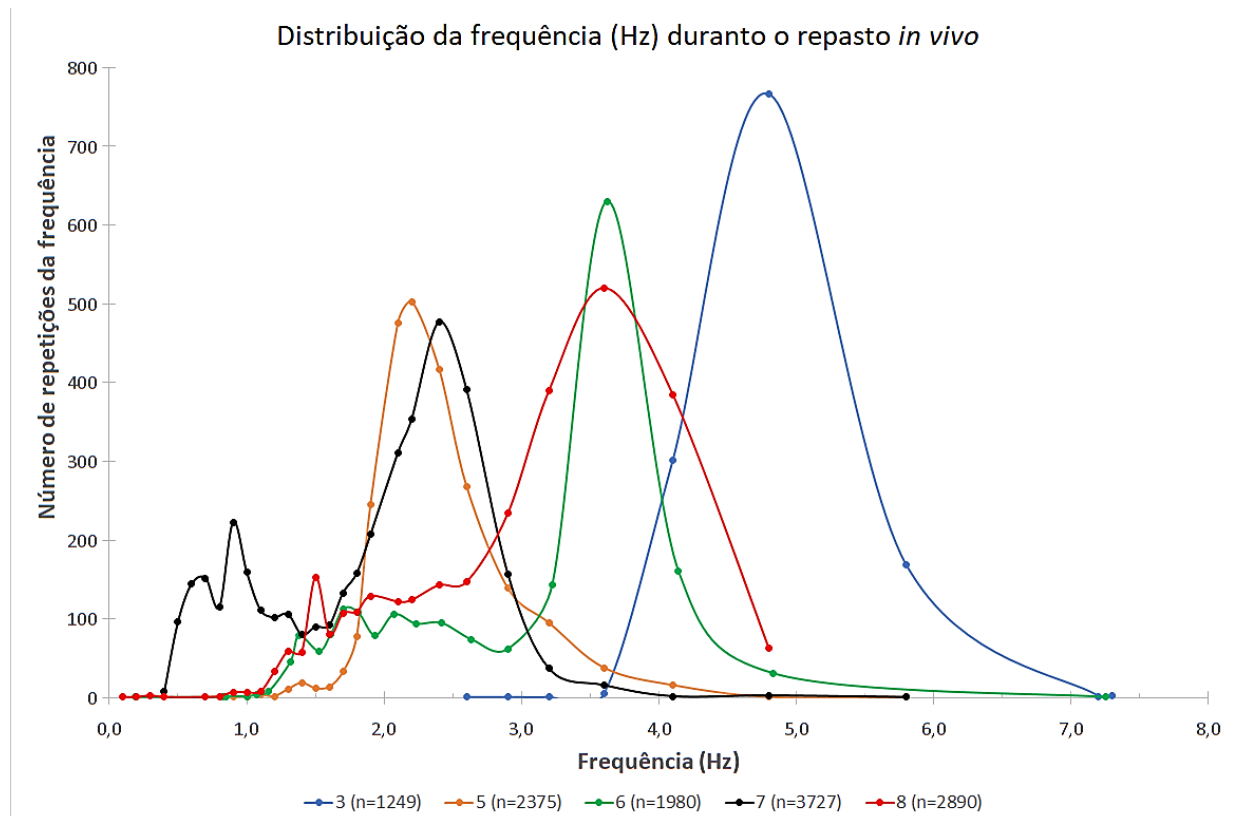
É interessante destacar que o perfil de variação da frequência média dos cinco experimentos iniciou com valores relativamente baixos, que aumentaram até atingir valores maiores entre 20 à 50% do tempo/experimento. Em seguida, na 2ª metade da alimentação, esses valores foram reduzindo até atingir os menores valores quando próximo ao final dos experimentos (Fig. 14A). Perfil semelhante foi observado nas velocidades de enchimento (Fig. 14C) e de esvaziamento da BC (Fig.6D), sendo a variação de cor durante o enchimento da BC, semelhante a observada no esvaziamento, durante todo o repasto sanguíneo dos insetos. Já os tempos do período (Fig. 14B), tempo de enchimento (Fig. 14E) e tempo de esvaziamento (Fig. 14F), apresentaram um perfil inverso ao da frequência (esperado no caso do período) com os menores valores na primeira metade (20-50%) e os maiores valores no início e próximo ao final da alimentação. Ressaltamos que esse perfil foi de certa forma semelhante ao observado nos experimentos de alimentação artificial com solução de Locke (exemplo: no caso da frequência média, onde se observou valores menores no início e no final e os maiores no meio da alimentação). Contudo, diferentemente do perfil simétrico observado nos experimentos com Locke (Fig. 12), *in vivo* observamos um perfil assimétrico com tendência de diminuição dos valores a partir da segunda metade da alimentação (Fig. 14A). Interessantemente, fato comum observado nos insetos desses dois grupos experimentais (*in vitro* com Locke e *in vivo*), foi que após o início da alimentação com um desempenho de bombeamento menos eficiente, os triatomíneos foram capazes de aumentar a sua frequência, reduzindo os tempos de enchimento e de esvaziamento por um período relativamente prolongado e apresentando valores mais homogêneos (ou seja, com menor dispersão dos valores). Nos experimentos *in vivo* a existência de períodos da alimentação apresentando valores mais homogêneos pode ser inferida pela curva que representa o número de vezes que cada frequência (instantânea) apareceu ao longo da alimentação (Fig. 15). Considerando a soma dos dois valores de frequência predominantes de cada experimento representaram (%) em relação ao número total de ciclos, eles corresponderam em média a ~ 44 % do tempo total de alimentação dos insetos, apresentando os seguintes valores por experimento: n° 3 (84,4%), n 5 (41,3%), n 6 (39,9%), n 8 (31,5%) e n 7 (23,3%). Esse aumento da sincronia entre os parâmetros dos ciclos da BC, possivelmente otimiza o processo de bombeamento por permitir um movimento mais homogêneo do alimento pela “cavidade da bomba-tubo digestivo”

diminuindo a sua inércia. Após esse aumento, em ambos os casos, há uma redução do desempenho do bombeamento, próximo ao final da alimentação.



**Figura 14.** Perfil de variação (%) dos parâmetros do ciclo de atividade da bomba cibarial ao longo da alimentação de ninfas de 3<sup>o</sup> estágio de *Rhodnius prolixus* na pele de camundongo hairless. O tempo de

alimentação do inseto foi dividido em 20 trechos, correspondendo a 5% do tempo total cada. A média dos valores por trecho de cada parâmetro foi calculada e determinada a sua variação (%) em relação ao valor da média de todo o tempo da alimentação (considerada 100%). (A) Frequência; (B) Período; (C) Velocidade de Enchimento; (D) Velocidade de Esvaziamento; (E) Tempo de Enchimento; (F) Tempo de Esvaziamento; (G) Variação de cor durante o Enchimento e o Esvaziamento. Cada ponto representa média de cinco experimentos  $\pm$  o erro padrão. As linhas tracejadas representam a média geral dos cinco experimentos no tempo total da alimentação + (vermelha) ou - (azul) o seu intervalo de confiança à 95%.

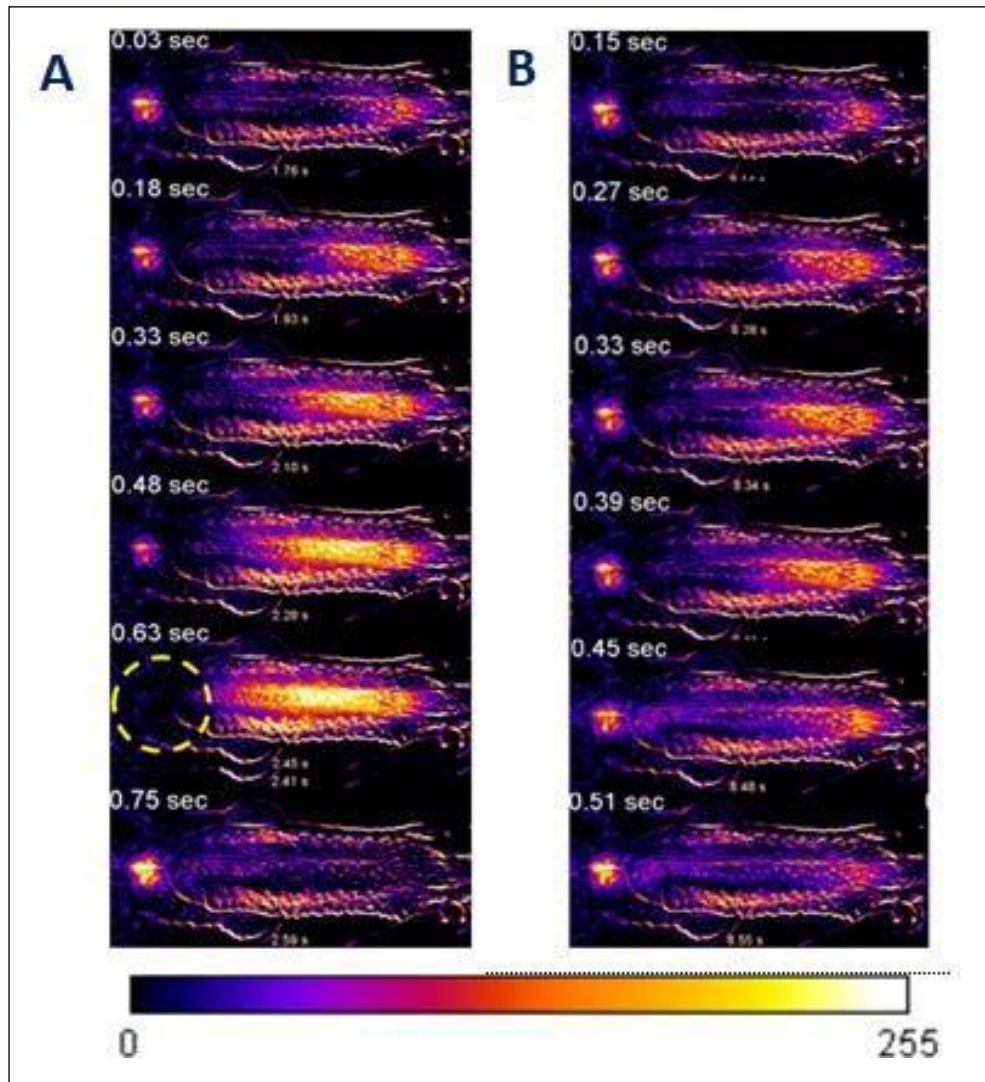


**Figura 15.** Distribuição dos valores de frequência instantânea (Hz) pelo número de vezes que apareceram ao longo da alimentação de ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* (n=5) alimentados na pele da orelha de camundongo *hairless*.

Considerando todos os parâmetros que foram utilizados para avaliar atividade da BC durante a alimentação *in vivo*, foi possível identificar que o inseto que apresentou maior dificuldade na obtenção do repasto sanguíneo foi o do experimento n 7. Assim, escolhemos este experimento para analisar o padrão de funcionamento da bomba cibarial, bem como, tentar identificar eventuais problemas no processo de bombeamento de líquidos.

### 5.2.1 Caracterização dos ciclos de atividade da bomba cibarial de *R. prolixus*

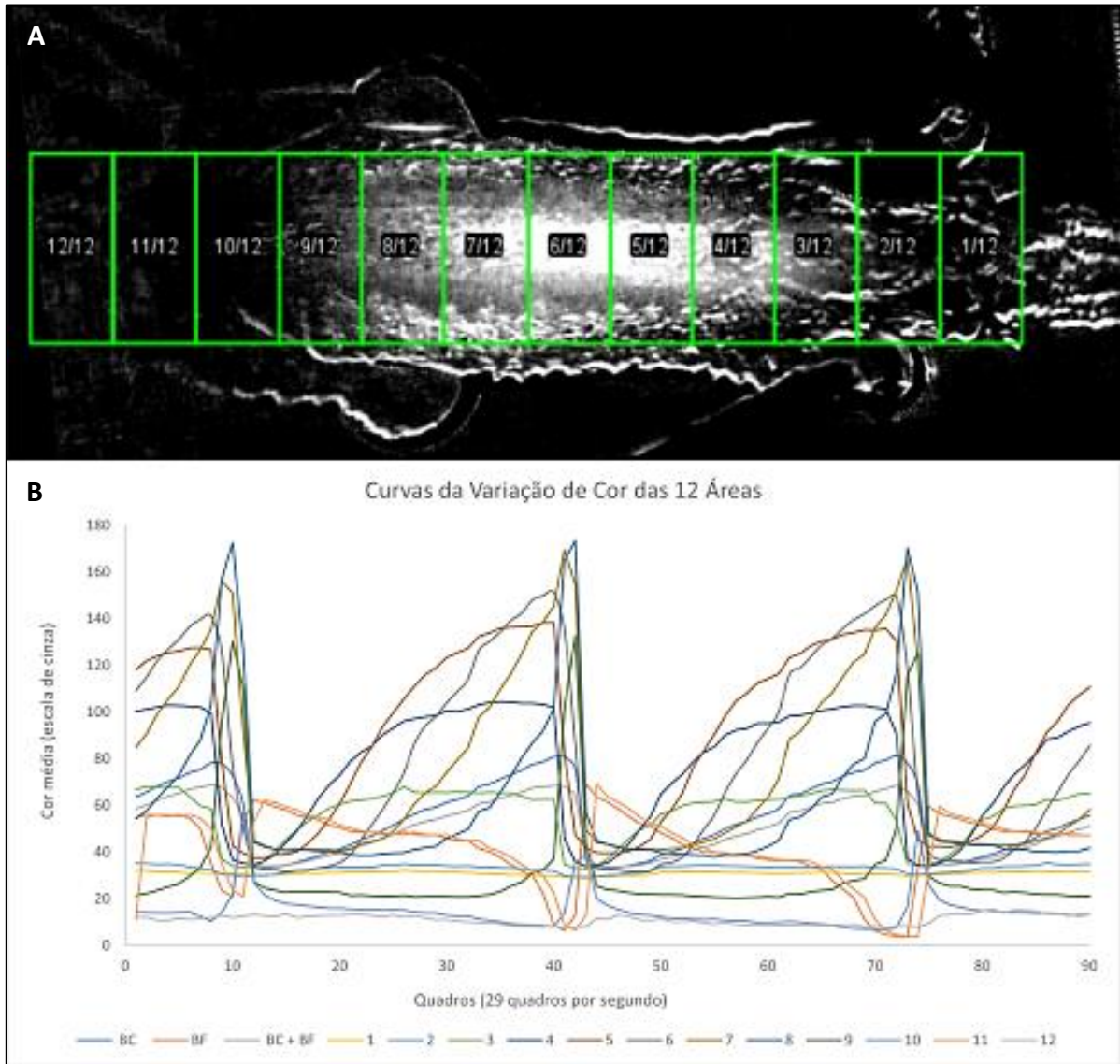
Para analisar os ciclos de enchimento e de esvaziamento da BC observados durante a alimentação do triatomíneo no experimento n° 7, selecionamos, inicialmente, um momento do repasto próximo a uma interrupção do bombeamento do sangue. Em seguida, no trecho selecionado, foram avaliados dois momentos: um no qual o fluxo de sangue pela BC ocorre normalmente, e outro no qual observamos o retorno do sangue para a região anterior à BC, ou seja, um movimento de “refluxo” (Fig. 16). Em ciclo normal de bombeamento, observa-se que o alimento começa a entrar (0,03 sec) na cavidade virtual da BC, formada pela contração da musculatura ligada à sua parede. O enchimento da cavidade continua até preencher ~50% da BC (0,48 sec). Assim que a região da bomba faringiana (BF) se esvazia/escurece (0,63 sec), o sangue passa para segunda metade da BC, que desaparece, sendo imediatamente empurrado para a região da BF que volta, então, a ficar cheia/clara (75' sec). Por sua vez, no ciclo em que ocorreu um “refluxo” o alimento começa a entrar (15'sec) e o enchimento continua até preencher ~50% da BC (0,33 sec). O sangue permanece ocupando a metade da BC, sem que haja o esvaziamento da BF (0,39 sec). Ocorre, então, a contração da BC (0,45 sec) impulsionando parte do sangue para região inicial (“refluxo”), na qual já havia começado o enchimento do próximo ciclo, e parte em direção a BF (0,51 sec). Esses resultados sugerem que a passagem/bombeamento do alimento pela BC descreve um movimento peristáltico.



**Figura 16.** Sequência de imagens da cabeça de uma ninfa de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* obtidas durante o repasto sanguíneo na pele de camundongo *hairless* mostrando a região da bomba cibarial. (A) Ciclo de enchimento/esvaziamento normal da bomba cibarial; (B) Ciclo de enchimento-esvaziamento apresentando “refluxo”. O experimento de alimentação foi gravado com a velocidade de 29 qps. Para facilitar a visualização da passagem do sangue pelo canal alimentar do inseto, primeiramente a imagem original em RGB foi convertida em “8bit green” (“split channels”). Em seguida, foi obtida uma imagem representando a “Max intensity” (“Z project”) de cada uma das duas sequências de imagens analisadas, e calculada a diferença entre a imagem “Max intensity” e a respectiva sequência de imagens (“Image calculator”). Finalmente, as imagens foram transformadas em “LUT fire”. A barra de cores representa a intensidade da escala de cinza “LUT fire”. O círculo amarelo com linha pontilhada mostra a região visível da bomba farigeana na cabeça do inseto.

Para testarmos a hipótese de que a passagem/bombeamento do alimento pela BC descreve um movimento peristáltico, foram selecionadas 12 regiões da cabeça do inseto, abrangendo o canal alimentar, desde a região anterior ao ponto de inserção das antenas até o final da cabeça, incluindo na área de observação uma pequena parte do protórax (Fig. 17A). Partindo da análise das curvas da variação de cor (escala de cinza) ao longo do tempo

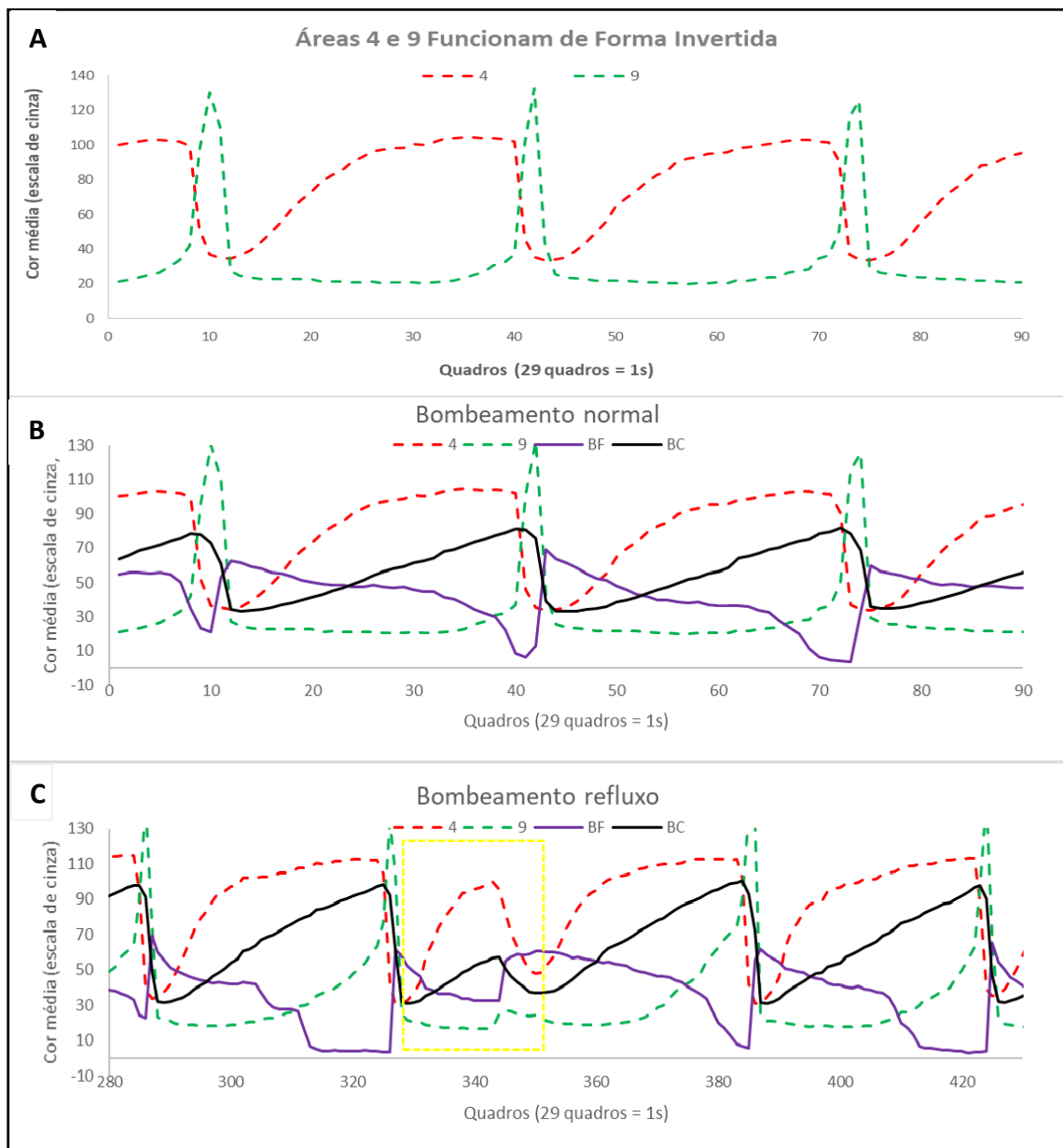
apresentada nas 12 regiões selecionadas, inicialmente descartamos as regiões 1 e 12 pois elas não captaram nenhuma variação cor associada a passagem do alimento (retas paralelas ao eixo x) (Fig.17B).



**Figura 17.** Curvas da variação de cor da bomba cibarial em atividade em 12 regiões da cabeça do triatomíneo. (A) Foto da cabeça de uma ninfa de *Rhodnius prolixus* mostrando as 12 regiões selecionadas (a área de cada região equivale 5777 pixels); (B) Curvas das 12 regiões selecionadas. O experimento de alimentação foi gravado com a velocidade de 29 qps. Para facilitar a visualização da passagem do sangue pelo canal alimentar do inseto, primeiramente a imagem original em RGB foi convertida em “8bit green” (“split channels”). Em seguida, foi obtida uma imagem representando a “Max intensity” (“Z project”) da sequência de imagens analisadas, e calculada a diferença entre a imagem “Max intensity” da sequência de imagens (“Image calculator”).

A partir do descarte das regiões 1 e 12, delimitamos a região 11 corresponde ao início da BF e as regiões de 2 a 10 correspondentes à BC. A análise das diferentes regiões da BC revelou que as regiões 4 e 9 funcionam de forma invertida (Fig. 18A). Dessa forma, a BC

funciona também como uma bomba peristáltica, evitando que haja refluxo do alimento para o sítio de alimentação do inseto, mesmo sem a presença de válvulas entre abertura do canal alimentar e a BC. A comparação em momentos de bombeamento normal (Fig. 18B) e naqueles nos quais se observa “refluxo (Fig. 18C), das curvas das regiões 4, 9, BC e BF, evidencia que o bombeamento normal exige que a BF esteja vazia, do contrário, o relaxamento dos músculos da BC ocorre sem que o alimento tenha passado para a segunda metade da bomba, ocasionando o refluxo. Além disso, embora a BF tenha uma musculatura circular associada à sua parede, que provavelmente regula o seu esvaziamento impulsionando o alimento para o intestino médio anterior, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que seu enchimento é passivo dependente, portanto, da ação da BC



**Figura 18.** Curvas da variação de cor da bomba cibarial em atividade em 12 regiões da cabeça do triatomíneo. (A) Curvas das regiões 4 e 9; (B) Curvas da bomba cibarial, da bomba faríngea e das regiões 4 e 9 durante um ciclo de enchimento-esvaziamento normal; (C) Curvas da BC, BF e das regiões 4 e 9 durante um ciclo de enchimento-esvaziamento apresentando “refluxo”. O experimento de alimentação foi gravado com a velocidade de 29 qps. Para facilitar a visualização da passagem do sangue pelo canal alimentar do inseto, primeiramente a imagem original em RGB foi convertida em “8bit green” (“split channels”). Em seguida, foi obtida uma imagem representando a “Max intensity” (“Z project”) da sequência de imagens analisadas, e calculada a diferença entre a imagem “Max intensity” da sequência de imagens (“Image calculator”). O retângulo amarelo com linha pontilhada mostra o registro das curvas no momento do refluxo, onde se observa que houve a contração quando o sangue ocupa apenas a região 4 da bomba cibarial.

## 6. DISCUSSÃO

Os triatomíneos normalmente requerem de 20 a 40 minutos para fazer um repasto de sangue em seus hospedeiros vertebrados, sendo esses, principalmente os mamíferos e os pássaros. O tamanho do repasto sanguíneo varia entre as espécies e o estágio de desenvolvimento do inseto. Nesse sentido, ninfas de *R. prolixus* e de *T. brasiliensis* podem ingerir de sangue em um único repasto até 9 vezes e 5 vezes o seu peso corporal, respectivamente (Friend *et al.*, 1965; Guarneri *et al.*, 2003). Ainda nesse sentido, diferença no repasto sanguíneo é observada entre machos e fêmeas de mesma espécie. As fêmeas adultas ingerem de sangue entre 2 (*T. brasiliensis*) e 3 (*R. prolixus*) vezes o seu peso corporal, enquanto os machos geralmente ingerem quantidades menores (Friend *et al.*, 1965; Guarneri *et al.*, 2003). O “ganho de peso” (tamanho da refeição) e a “taxa de ingestão” (ganho de peso/tempo de alimentação) são dois parâmetros comumente utilizados em estudos sobre o comportamento alimentar dos triatomíneos. Destaca-se que a taxa de ingestão é um bom indicador para o desempenho alimentar nesses insetos devido à sua sensibilidade às dificuldades encontradas por eles durante alimentação (ex. aumento do tempo de sondagem, interrupção durante a alimentação de sangue, redução da frequência de bombeamento do sangue) (Pereira *et al.*, 2006).

Nos triatomíneos, a maior parte do tempo de alimentação é usado para a sucção do sangue, que deve ser conduzido dos vasos da pele do hospedeiro até o intestino médio do inseto, local onde é inicialmente armazenado. Em alimentador artificial, frente a dietas com viscosidade semelhante à do sangue, o volume ingerido por cada contração e frequência

máxima da BC está relacionado às características mecânicas intrínsecas do aparato de alimentação desses insetos (Sant'Anna *et al.*, 2001).

O efeito da viscosidade do sangue/plasma na interação triatomíneo-hospedeiro vertebrado é ainda pouco compreendido. Existe também uma grande variação na viscosidade do sangue de diferentes espécies de vertebrados (Windberger & Baskurt, 2007). Windberger e colaboradores (2003) compararam a viscosidade do sangue em nove espécies de mamíferos, nesse estudo os autores demonstraram a variação dos valores da viscosidade do sangue é inversamente proporcional a taxa de cisalhamento. As diferenças da viscosidade do sangue entre estas espécies é muito maior em baixa taxa de cisalhamento (0,7 s<sup>-1</sup>), variando de 6,56 (bovinos) a 38,17 mPas (equinos), do que quando o sangue é submetido a alta taxa de cisalhamento (94 s<sup>-1</sup>) onde a variação foi de 4,04 (coelhos) a 6,29 mPas (ratos). O percentual de hematócrito presente no sangue é um dos fatores que influencia na viscosidade como observado por Windberger e Baskurt (2007), que em mamíferos, o hematócrito varia de 30 a 50%, que são valores altos em comparação às aves, que geralmente apresentam valores de hematócrito e a viscosidade do sangue menor. Enquanto, em vertebrados peilotérmicos não apresenta valores fixos, pois este parâmetro varia de acordo com a temperatura corporal que depende do ambiente. Além disso, a viscosidade do sangue irá variar também por fatores relacionados à homeostasia que também difere quanto a aves e mamíferos. Durante o repasto sanguíneo ocorre dano tecidual em decorrência da movimentação das peças bucais dos insetos, desencadeando uma resposta hemostática como a cascata de coagulação que altera a viscosidade do sangue refletindo sobre a dificuldade do bombeamento do mesmo através do tubo digestivo, para o intestino médio do inseto (Puckett *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2007; Paim *et al.*, 2011). Entretanto a cascata de coagulação aparentemente tem maior importância em mamíferos, enquanto em aves aparentemente tem menor importância onde vários fatores desta via da coagulação estão ausentes ou em concentrações muito baixas (Lewis, 1996).

Utilizando um alimentador artificial, Smith (1979) demonstrou em ninfas de 5º estágio *R. prolixus* que o aumento da viscosidade da dieta de 0,8 a 6,5 cP reduziu a taxa de ingestão em aproximadamente um terço (de 26,2 ml/min para 8,5 ml/min). Tal fato se deve a uma redução na frequência de bombeamento, bem como na quantidade média de líquido ingerido (nl ou lg) por contração bomba cibarial (QLC). No presente estudo, a taxa de ingestão apresentada pelos insetos alimentados em uma solução de menor viscosidade (Locke 0,78/mPa a 60rpm) foi ~7,5 vezes maior (17,2- 2,3 mg/min) em relação aos alimentados na solução mais viscosa (Dextran 6,9 mPa a 60rpm), sendo que 50% desta diferença

provavelmente está relacionada ao fato da frequência média ter sido 2x maior nos insetos alimentados em Locke. O restante da diferença entre as taxas de ingestão que observamos entre os nossos dois grupos experimentais, deve estar relacionada a redução da QLC, como demonstrado por Smith (1979). Entretanto, pelo fato de não termos contabilizado o número total de ciclos/bombadas nesses experimentos não foi possível estimar a QLC. É importante mencionar que no estudo de Smith (1979) foi utilizado o eletromiograma da bomba cibarial para a obtenção do número de bombadas total durante os experimentos de alimentação sendo que a QLC foi estimada a partir do ganho de peso dos insetos.

No presente estudo desenvolvemos uma metodologia de análise de imagens que nos permitiu identificar o período de enchimento e o de esvaziamento de cada ciclo da BC. Desta forma, foi possível avaliar o efeito da viscosidade da dieta no ciclo de atividade da BC, e consequentemente, na performance alimentar dos insetos ao longo do repasto. Assim, considerando o desempenho do bombeamento dos insetos alimentados com as duas dietas artificiais (Locke e Dextran) nos três trechos avaliados (I, M, F), só observamos diferença entre os parâmetros “frequência” e “tempos de enchimento e de esvaziamento” no meio do repasto. Ou seja, os insetos alimentados com a solução de maior viscosidade (Dextran) não foram capazes de melhorar o desempenho de bombeamento ao longo da alimentação, aumentando a frequência e diminuindo os tempos de enchimento e de esvaziamento, como observamos nos insetos alimentados com solução de menor viscosidade (Locke).

Essa capacidade de melhorar o desempenho alimentar ao longo da alimentação, observada nos insetos alimentados na solução menos viscosa (Locke) e no hospedeiro vivo, está relacionada ao aumento de frequência e, necessariamente decorre de uma diminuição do tempo do ciclo de atividade da BC (período). Contudo é importante salientar que essa redução na duração do período foi em média, distribuída proporcionalmente entre os tempos de enchimento e de esvaziamento da BC. Além disso, essa proporcionalidade entre os tempos de enchimento e de esvaziamento sugerem haver uma “interdependência” entre esses dois eventos. Nesse sentido, a diminuição da dispersão dos valores destes dois eventos, também observada nestes momentos de maior eficiência de bombeamento, poderia permitir ao inseto ingerir uma quantidade maior de líquidos em um menor intervalo de tempo.

Os parâmetros introduzidos nos experimentos *in vivo* de “velocidade de enchimento e de esvaziamento”, que também aumentaram nos períodos de maior performance alimentar do triatomíneo, sugerem a ingestão de uma quantidade maior de sangue por ciclo da BC nestes

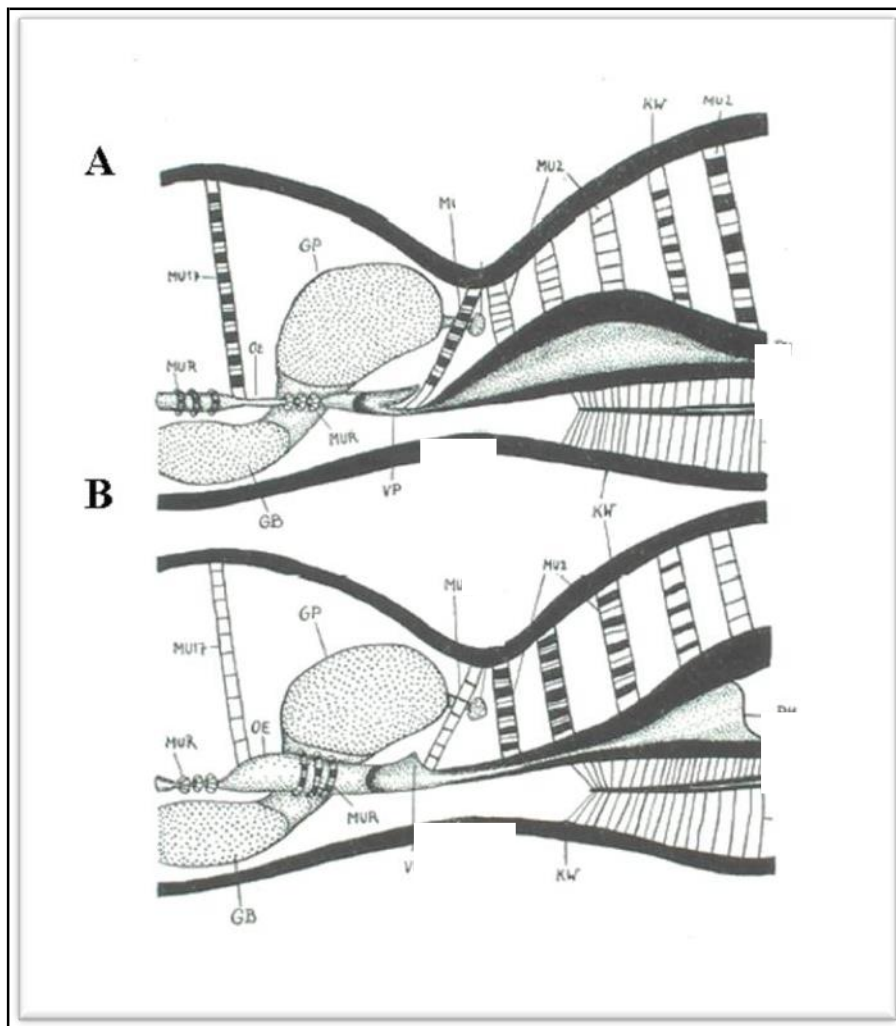
momentos. No entanto, uma limitação dos experimentos de alimentação no hospedeiro vivo foi não termos mensurado o ganho de peso dos insetos após o repasto. Essa informação nos permitiria correlacionar a variação de cor observada ao longo do enchimento da BC/ciclo ao volume médio de sangue ingerido. Ainda nesse sentido, o cotejamento entre os valores da QLC média e a variação de cor durante o enchimento de cada ciclo da BC entre os cinco experimentos, poderia sugerir se existe ou não uma correlação entre esses dois parâmetros.

A menor performance do bombeamento no início e no fim da alimentação apresentada pelos insetos alimentados em Locke e *in vivo* possivelmente está relacionada a fatores inerentes ao inseto e não a diferenças entre as dietas. Uma possível explicação para esse perfil seria uma maior dificuldade do inseto em bombear a dieta devido a resistência da cutícula abdominal durante o enchimento do intestino médio anterior. Essa maior resistência no começo da alimentação, estaria relacionada ao tempo para iniciar o processo de plasticização da cutícula abdominal. Em triatomíneos, a plasticização da cutícula faz com que o tegumento abdominal se estenda assim que os insetos iniciam a alimentação, permitindo assim a acomodação de grandes quantidades de sangue no intestino médio anterior (Bennet- Clark, 1962). Esta plastificação da cutícula em *R. prolixus* é controlada por uma liberação do neurotransmissor serotonina na hemolinfa logo após o início da alimentação de sangue (Orchard, 2006). Já o declínio na frequência da BC, apresentada próximo ao final da alimentação, seria uma consequência da contrapressão gerada pela resistência da cutícula abdominal durante o enchimento do intestino médio anterior (Bennet-Clark, 1963a). Interessante que esta redução de frequência da BC no próximo ao final da alimentação também é observada quando os triatomíneos se alimentam em hospedeiros vivos (Guarneri *et al.*, 2003).

Diferentemente dos insetos alimentados com solução de Locke, nos quais se observou um perfil simétrico no aumento da performance ao longo da alimentação, nos insetos alimentados *in vivo*, verificou-se um perfil assimétrico, com uma nítida tendência de diminuição dos valores a partir da segunda metade da alimentação. A explicação para esse fato pode estar relacionada a resposta fisiológica do hospedeiro no sítio de alimentação, pois durante a fase de ingurgitamento, a vibração no vaso canulado, ocasionada pela atividade da BC, provavelmente gera um estresse mecânico no endotélio. Isso ocorre devido a uma pulsação abrupta da parede do vaso e uma forte oscilação do fluxo sanguíneo, tornando o local de alimentação um microambiente adequado para desencadear a agregação plaquetária, recrutamento de leucócitos e coagulação sanguínea (Soares *et al.*, 2014). Essa resposta do

hospedeiro, por sua vez, alteraria as propriedades do sangue no sítio de alimentação dos insetos (ex. viscosidade) (Sant'Anna *et al.*, 2017).

Um dos primeiros estudos que apresentou informações sobre o funcionamento da BC dos triatomíneos, foi o de Barth (1952), o primeiro (Parte I) da primorosa série de artigos “Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae)”. Nesse trabalho, o autor deu destaque as estruturas da cabeça de *T. infestans*, propondo um mecanismo de sucção de sangue para este triatomíneo baseado em informações microanatômicas do canal alimentar e de suas estruturas associadas. A partir da observação do repasto desses insetos *in vivo*, como esquematizado na figura 19, o autor detalhou os principais eventos envolvidos durante a passagem do sangue da parte posterior da faringe (“BC”) para o esôfago (“BF”).



**Figura 19.** Esquema do corte longitudinal da região posterior da bomba cibarial (“faringe” - PH) e o início do esôfago (OE) mostrando o processo de ingestão do sangue. (A) Momento em que as últimas fibrilas do 2º grupo de músculos dilatadores da BC (MU2) se contraíram e uma gota de sangue foi sugada para trás. A válvula (VP) está fechada, uma vez que 3º grupo de músculos dilatadores da bomba cibarial (MU3) está relaxado. (B)

Momento em que as últimas fibrilas do MU2 estão se relaxando, e a parede (“teto”) elástica retorna a sua posição original da BC empurrou (pelo “fechamento” da cavidade da bomba nesta região) a gota sanguínea pela válvula (VP) aberta pela contração de MU3 para dentro do esôfago (“BF”), cujo primeiro grupo dos músculos anelares (MUR) é relaxado enquanto o músculo dilatador do esôfago se contraiu (MU17). Pela contração dos músculos anelares (MUR) anteriores e do músculo dilatadores do esôfago (MU17), e a dilatação dos músculos anelares posteriores localizados posteriormente (como aparece em A), continua o movimento do alimento em direção ao intestino médio anterior”. Extraído de Barth (1952). Legenda: (GB) Gânglio subesofágico; (GP) Gânglio supraesofágico; (KW) Parede crânica (“crânea”).

De acordo com Barth (1952) a passagem do alimento pela bomba cibarial de *T. infestans* seria coordenada por ciclos alternados de contração e relaxamento dos três grupos de músculos dilatadores no sentido anteroposterior. Tal hipótese corrobora os nossos resultados (Fig. 16) que sugerem que a ingestão de sangue por *R. prolixus* seja auxiliada por movimento peristáltico da parede elástica da bomba. Entretanto, não é conhecido se a distribuição dos músculos dilatadores da BC de *R. prolixus* segue o mesmo padrão e possuem um padrão de contração/relaxamento descrito em *T. infestans*, uma vez que a forma, volume (~QLC) e frequência funcionais da BC entre as duas espécies são distintos. Em triatomíneos, a QLC difere entre as espécies, variando de 27 nl para ninfas de quinto estágio de *T. pseudomaculata* até aproximadamente 101 nl para *T. infestans* (Guarneri *et al.*, 2000a). Durante o desenvolvimento pós-embrionário de *T. brasiliensis*, a QLC cresce assimetricamente, aumentando ~23 vezes entre as ninfas do primeiro ao quinto estágio. Nesse mesmo período, o peso corporal do inseto aumenta em ~55 vezes quando comparado ao peso inicial. Nos adultos o volume da BC (QLC) é um parâmetro que apresenta um nítido dimorfismo sexual em *T. brasiliensis* adulto, sendo 31% maior nas fêmeas do que nos machos (Guarneri *et al.*, 2003).

Outro aspecto ainda pouco compreendido é o papel da coordenação do ciclo de contração/relaxamento entre a BC e a BF no desempenho alimentar dos triatomíneos. Recentemente, Lahondere *et al.* (2017) utilizando imagens de *R. prolixus* durante o processo de ingestão de líquido captadas com scanner de microtomografia computadorizada, demonstraram que a frequência da BF e da BC é a mesma, contudo apresentam movimentos de contração-relaxamento invertidos. A importância desse sincronismo entre a BC/BF para o bombeamento do alimento foi evidenciada em nosso estudo, uma vez que durante o repasto, nos momentos em que o esvaziamento da BF “atrasou” seguiu-se da ocorrência de “refluxo” e, provavelmente, uma redução do volume ingerido pela BC (redução da variação de cor entre o enchimento e o esvaziamento da bomba (Figs. 16 -18)).

Os achados obtidos na maior parte dos estudos sobre o comportamento alimentar dos triatomíneos em hospedeiros vivos, foram obtidos majoritariamente a partir de duas metodologias: i) a microscopia intravital, que destaca especialmente as imagens captadas no sítio do repasto dos insetos na pele do hospedeiro (Lavoipierre *et al.*, 1959; Soares *et al.*, 2014) e/ou ii) o eletromiograma (ou eletropenetrograma), que analisa os sinais elétricos produzidos durante o repasto dos barbeiros. Inegavelmente, o conhecimento gerado usando tais metodologias, trouxe enormes contribuições, sendo fundamental para o estado da arte nesse tópico da biologia dos triatomíneos. Os estudos baseados nas imagens captadas durante a alimentação dos insetos no hospedeiro permitiram caracterizar as fases de alimentação e demonstrar que os barbeiros retiram o sangue diretamente dos vasos sanguíneos do hospedeiro (Lavoipierre *et al.*, 1959), mecanismo posteriormente denominado de solenofagia (Lavoipierre, 1964). Adicionalmente, caracterizaram-se as alterações desencadeadas na microcirculação da pele no sítio de alimentação dos triatomíneos, demonstrando a vasodilatação, o aumento de permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos e de plaquetas principalmente no final do repasto dos insetos (Soares *et al.*, 2014). Ressalta-se, ter sido esse o primeiro estudo que a partir de imagens da região da bomba cibarial na cabeça dos triatomíneos, demonstrou a correspondência entre a atividade da bomba cibarial (medida pela variação da área ocupada pelo sangue na cavidade da bomba) e os picos dos sinais elétricos pelo eletromiograma (Soares *et al.*, 2014). Contudo, desde o trabalho pioneiro de Smith (1979) até o presente momento, o perfil do eletromiograma tem sido utilizado apenas como um marcador se o inseto está bombeando ou não a dieta. Dessa forma, destacamos a importância do trabalho aqui apresentado, que padronizou uma metodologia para análise de imagens obtidas pela técnica do eletromiograma e/ou da microscopia intravital, permitindo um estudo mais informativo e detalhado do funcionamento da bomba cibarial de *R. prolixus* frente a diferentes dietas. Para otimizar essa metodologia, recomendamos: i) registrar o peso dos insetos antes e após a alimentação e ii) imobilizar os insetos de forma a impedi-los de deslocar durante o experimento, pois toda vez que o inseto muda de posição é necessário reposicionar a máscara delimita a região das bombas de alimentação (BC e BF).

## 7. CONCLUSÕES

- A partir da análise de imagens (variação da cor) captadas do dorso da cabeça de *Rhodnius prolixus* foi possível registrar a frequência de atividade da bomba cibarial (BC) e da bomba faríngea (BF) durante o repasto dos insetos.
- A planilha de cálculo baseada na função SE do programa Excel elaborada no presente estudo permitiu a determinação dos picos e dos vales a partir dos dados da curva da variação da cor apresentada pela BC em atividade, permitindo o cálculo do tempo de enchimento e de esvaziamento de cada ciclo de atividade de bomba cibarial de *Rhodnius prolixus*. Baseado nestes tempos, foi possível calcular outros parâmetros relacionados a atividade da BC (ex. período, velocidade de enchimento e de esvaziamento, variação de cor durante as fases de enchimento e de esvaziamento).
- A alteração da viscosidade da dieta artificial (de 0,78 a 6,9 mPa a 60rpm) impactou negativamente na taxa de ingestão de *Rhodnius prolixus*, diminuindo a frequência da bomba cibarial e o tamanho do repasto sanguíneo. Os insetos alimentados com uma solução de maior viscosidade (Dextran: 6,9 mPa) não foram capazes de aumentar o seu desempenho de bombeamento ao longo da alimentação, como observado nos insetos alimentados com uma dieta menos viscosa (Locke: 0,78 mPa) ou no hospedeiro vivo.
- Os insetos alimentados com Locke e com o hospedeiro apresentam uma pior performance de bombeamento no início e no fim do repasto, provavelmente devido um fator intrínseco ao inseto, que deve estar relacionado com a dificuldade de esvaziar a BC pela contrapressão gerada pela resistência da cutícula abdominal durante o enchimento do intestino médio anterior presentes nesses momentos da alimentação.
- O melhor desempenho de bombeamento de *Rhodnius prolixus* alimentados em hospedeiro vivo é observado na primeira metade do repasto sanguíneo.
- O padrão do deslocamento do líquido nas diferentes regiões de *Rhodnius prolixus* da BC sugere que a ingestão de sangue nesse inseto seja auxiliada pelo movimento peristáltico da parede elástica da bomba.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves CL 2011. Caracterização de atividades salivares e intestinais relacionadas ao processo alimentar de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera:Reduviidae) sobre hospedeiros invertebrados e vertebrados.
- Amino R, Tanaka AS, Schenkman S 2001. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 465–472.
- Andersen JF, Francischetti IMB, Valenzuela JG, Schuck P, Ribeiro JMC 2003. Inhibition of Hemostasis by a High Affinity Biogenic Amine-binding Protein from the Saliva of a Blood-feeding Insect \*. *J. Biol. Chem.* 278: 4611–4617.
- Andersen JF, Ribeiro JMC 2017. Salivary Kratagonists: Scavengers of Host Physiological Effectors During Blood Feeding. *Arthropod Vector Control. Dis. Transm. Vol. 2:* 51–63.
- Aragão MB 1981. Sobre a domiciliação dos triatomíneos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 14: 13–27.
- Araujo RN, Campos ITN, Tanaka AS, Santos A, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH 2007. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *Int. J. Parasitol.* 37: 1351–1358.
- Araujo RN, Gontijo NF, Guarneri AA, Gontijo AF, Soares AC, Pereira MH 2011. Electromyogram of the Cibarial Pump and the Feeding Process in Hematophagous Hemiptera. *Adv. Appl. Electromyogr.*
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 683–693.
- Araujo RN, Soares AC, Paim RMM, Gontijo NF, Gontijo AF, Lehane MJ, Pereira MH 2009. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 83–89.
- Arcà B, Ribeiro JM 2018. Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. *Curr. Opin. Insect Sci.* 29: 102–109.
- Baptist BA 1941. The Morphology and Physiology of the Salivary Glands of Hemiptera-Heteroptera. *J. Cell Sci.* s2-83: 91–139.

- Barrozo RB, Lazzari CR 2004. Orientation Behaviour of the Blood-sucking Bug *Triatoma infestans* to Short- chain Fatty Acids: Synergistic Effect of l-Lactic Acid and Carbon Dioxide. *Chem. Senses* 29: 833–841.
- Barrozo RB, Lazzari CR 2006. Orientation response of haematophagous bugs to CO<sub>2</sub>: The effect of the temporal structure of the stimulus. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 192: 827–831.
- Barrozo RB, Minoli SA, Lazzari CR 2004. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *J. Insect Physiol.* 50: 249–254.
- Baskurt OK, Meiselman HJ 2003. Blood Rheology and Hemodynamics. *Semin. Thromb. Hemost.* 29: 435–450.
- Bennet-Clark HC 1962. Active control of the mechanical properties of insect endocuticle. *J. Insect Physiol.* 8: 627–633.
- Bennet-Clark HC 1963. Negative Pressures Produced in the Pharyngeal Pump of the Blood-Sucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 40: 223–229.
- Buxton PA 1930. The Biology of a Blood-Sucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans. Entomol. Soc. London* 78. Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87–93.
- Chagas C 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159–218.
- Champagne DE 2005. Antihemostatic Molecules from Saliva of Blood-Feeding Arthropods. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34: 221–227.
- Champagne DE, Nussenzveig RH, Ribeiro JMC 1995. 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.* 270: 8691–8695.
- Chapman RF 1995. Chemosensory Regulation of Feeding. *Regul. Mech. Insect Feed.*: 101–136.
- Chapman RF 2013. *Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion* (GA Kerkut and LI Gilbert, Eds.). Pergamon Press, Cambridge.

- Costa J, Dale C, Galvão C, Almeida CE, Dujardin JP 2021. Do the new triatomine species pose new challenges or strategies for monitoring Chagas disease? An overview from 1979-2021. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 116: e210015.
- Daniel TL, Kingsolver JG 1983. Feeding strategy and the mechanics of blood sucking in insects. *J. Theor. Biol.* 105: 661–677.
- Dujardin JP, Thi KP, Xuan LT, Panzera F, Pita S, Schofield CJ 2015. Epidemiological status of kissing-bugs in South East Asia: A preliminary assessment. *Acta Trop.* 151: 142–149.
- Flores GB, Lazzari CR 1996. The role of the antennae in *Triatoma infestans*: Orientation towards thermal sources. *J. Insect Physiol.* 42: 433–440.
- Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silveira AC 1982. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na região central do Brasil. *Rev. Saude Publica* 16: 171–204.
- forattini op, rabello ex, alves ferreira o 1984. Aspectos ecologicos da tripanossomiase americana. xxi - comportamento de especies triatomineas silvestres na reinfestacao do intra e peridomicilio. *Rev. Saude Publica* 18: 185–208.
- Francischetti IMB, Ribeiro JMC, Champagne D, Andersen J 2000. 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.* 275: 12639–12650.
- Friend WG, Smith JJB 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: Mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J. Insect Physiol.* 17: 233–243.
- Friend WG, Smith JJB 1985. E a fisiología de los triatominos con especial referencia a la alimentación por sangre: 55–72.
- Galvão C 2014. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Sociedade Brasileira de Zoologia.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DDS, Jurberg J 2003. 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* 202: 1–36–1–36.
- Gillett JD 1967. Natural selection and feeding speed in a blood-sucking insect. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 167: 316–329.
- Golodne DM, Monteiro R, Graça-Souza A V., Silva-Neto MAC, Atella GC 2003. Lysophosphatidylcholine Acts as an Anti-hemostatic Molecule in the Saliva of the Blood-sucking Bug *Rhodnius prolixus* \*. *J. Biol. Chem.* 278: 27766–27771.

- Gontijo ED, Andrade GMQ de, Santos SE, Galvão LM da C, Moreira EF, Pinto FS, Dias JCP, Januário JN 2009. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 18: 243–254.
- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH 2000. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J. Insect Physiol.* 46: 1121–1127.
- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH 2003. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. *Acta Trop.* 87: 361–370.
- Gudderra NP, Ribeiro JMC, Andersen JF 2005. Structural Determinants of Factor IX(a) Binding in Nitrophorin 2, a Lipocalin Inhibitor of the Intrinsic Coagulation Pathway \*. *J. Biol. Chem.* 280: 25022–25028.
- Guerenstein P, Guerin P 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *J. Exp. Biol.* 204: 585–597.
- Hellmann K, Hawkins RI 1965. Prolixin-S and prolixin-G; Two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stål. *Nature* 207: 265–267.
- Hellmann K, Hawkins RI 1964. Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from *Rhodnius prolixus* Stål. *Nat.* 1964 2014923 201: 1008–1009.
- Ianowski JP, Manrique G, Núñez JA, Lazzari CR 1998. Feeding is not necessary for triggering plasticization of the abdominal cuticle in haematophagous bugs. *J. Insect Physiol.* 44: 379–384.
- Kalvachová P, Hřibálová V, Kodým P, Volf P 1999. Modulation of Murine Lymphocyte Responsiveness by the Saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 36: 341–344.
- Kingsolver JG, Daniel TL 1995. Mechanics of Food Handling by Fluid-Feeding Insects. *Regul. Mech. Insect Feed.:* 32–73.
- Kollien AH, Schaub GA 2000. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today* 16: 381–387.

- Lahondère C, Insausti TC, Paim RMM, Luan X, Belev G, Pereira MH, Ianowski JP, Lazzari CR 2017. Countercurrent heat exchange and thermoregulation during blood-feeding in kissing bugs. *Elife* 6.
- Lavoipierre MMJ, Dickerson G, Gordon RM 1959. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 53: 235–250.
- Lazzari CR 1990. Fisiologia del comportamiento de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera:Reduviidae). Orientación térmica.
- Lazzari CR 2017. Celebrating the sequencing of the *Rhodnius prolixus* genome: A tribute to the memory of Vincent B. Wigglesworth. *J. Insect Physiol.* 97: 1–2.
- Lazzari CR, Núñez J 1989. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* 35: 525–529.
- Lehane MJ 1991. The importance of blood-sucking insects. *Biol. Blood-Sucking Insects*: 1–5.
- Lehane MJ 2005. *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. Cambridge University Press, New York.
- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 163: 123–520.
- Lewis JH 1996. Comparative Hemostasis. *Comp. Hemost. Vertebr.*: 325–359.
- Lorenzo MG, Lazzari CR 1998. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* 70: 163–170.
- Luz C, Fargues J, Grunewald J 1999. Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under Constant and Cyclic Conditions of Temperature and Humidity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 403–409.
- Maddrell SHP 1963. Control of Ingestion in *Rhodnius prolixus* Stål. *Nat.* 1963 1984876 198: 210–210.
- Marconato E [UNESP], Ponsoni EJ [UNESP], Barata JMS, Rosa JA [UNESP] Da 2006. Estudo biológico e biométrico dos estádios ninfais de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) sob condições laboratoriais. *Scopus*: 157–161.
- Marcondes CB, Dias JC, Guedes LA, Ferraz Filho AN, Rodrigues VL, Mendonça DD 1991. Epidemiologic study of the sources of blood feeding of the triatominae of the Aroeira farm (Catolé do Rocha, Paraíba) and neighboring localities. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24: 137–140.
- Mesquita RD, Vionette-Amaral RJ, Lowenberger C, Rivera-Pomar R, Monteiro FA, Minx P, Spieth J, Carvalho AB, Panzera F, Lawson D, Torres AQ, Ribeiro JMC, Sorgine MHF,

Waterhouse RM, Montague MJ, Abad-Franch F, Alves-Bezerra M, Amaral LR, Araujo HM, Araujo RN, Aravind L, Atella GC, Azambuja P, Berni M, Bittencourt-Cunha PR, Braz GRC, Calderón-Fernández G, Carareto CMA, Christensen MB, Costa IR, Costa SG, Dansa M, Dumas-Filho CRO, De-Paula IF, Dias FA, Dimopoulos G, Emrich SJ, Esponda-Behrens N, Fampa P, Fernandez-Medina RD, Fonseca RN da, Fontenele M, Fronick C, Fulton LA, Gandara AC, Garcia ES, Genta FA, Giraldo-Calderón GI, Gomes B, Gondim KC, Granzotto A, Guarneri AA, Guigó R, Harry M, Hughes DST, Jablonka W, Jacquín-Joly E, Juárez MP, Koerich LB, Lange AB, Latorre- Estivalis JM, Lavore A, Lawrence GG, Lazoski C, Lazzari CR, Lopes RR, Lorenzo MG, Lugon MD, Majerowicz D, Marcet PL, Mariotti M, Masuda H, Megy K, Melo ACA, Missirlis F, Mota T, Noriega FG, Nouzova M, Nunes RD, Oliveira RLL, Oliveira-Silveira G, Ons S, Orchard I, Pagola L, Paiva-Silva GO, Pascual A, Pavan MG, Pedrini N, Peixoto AA, Pereira MH, Pike A, Polycarpo C, Prosdocimi F, Ribeiro-Rodrigues R, Robertson HM, Salerno AP, Salmon D, Santesmasses D, Schama R, Seabra-Junior ES, Silva- Cardoso L, Silva-Neto MAC, Souza-Gomes M, Sterkel M, Taracena ML, Tojo M, Tu ZJ, Tubio JMC, Ursic- Bedoya R, Venancio TM, Walter-Nuno AB, Wilson D, Warren WC, Wilson RK, Huebner E, Dotson EM, Oliveira PL 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 14936–14941.

Mulgrew-Nesbitt A, Diraviyam K, Wang J, Singh S, Murray P, Li Z, Rogers L, Mirkovic N, Murray D 2006. The role of electrostatics in protein–membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761: 812–826.

Núñez JA 1982. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. Entomol. Res.* 72: 253–262.

Panamerican Health Organization 2019. OPAS/OMS Brasil - OPAS divulga novo guia para diagnóstico e tratamento da doença de Chagas. *Organ. Pan-Americana da Saúde*.

Orchard I 2006. Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug,

*Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 144: 316–324.

Paim RMM, Araújo RN, Soares AC, Lemos LCD, Tanaka AS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH 2011. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *Int. J. Parasitol.* 41: 765–773.

Pereira MH, Gontijo NF, Guarneri AA, Sant’Anna MRV, Diotaiuti L 2006. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol.* 22: 516–520.

- Pereira MH, Souza MEL, Vargas AP, Martins MS, Penido CM, Diotaiuti L 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Trop.* 61: 255–261.
- Puckett LG, Lewis JK, Urbas A, Cui X, Gao D, Bachas LG 2005. Magnetoelastic transducers for monitoring coagulation, clot inhibition, and fibrinolysis. *Biosens. Bioelectron.* 20: 1737–1743.
- Ramirez Pérez J 1969. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. : 98–98.
- Ranucci M, Laddomada T, Ranucci M, Baryshnikova E 2014. Blood viscosity during coagulation at different shear rates. *Physiol. Rep.* 2: e12065.
- Reynolds SE. The mechanism of plasticization of the abdominal cuticle in *Rhodnius*. *exp. Biol* 62: 81–98. Ribeiro JM 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 463–478.
- Ribeiro JM 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4: 143–152.
- Ribeiro JMC, Assumpção TC, Francischetti IMB 2012. An insight into the sialomes of bloodsucking Heteroptera. *Psyche (London)*.
- Ribeiro JMC, Francischetti IMB 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives\*. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.060402.102812> 48: 73–88.
- Ribeiro JMC, Garcia ES 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 26: 303–307.
- Ribeiro JMC, Garcia ES 1981. The role of the salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. exp. Biol.* 94–219.
- Ribeiro JMC, Schneider M, Guimarães JA 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 308: 243–249.
- Ribeiro JMC, Schneider M, Isaias T, Jurberg J, Galvão C, Guimarães JA 1998. Role of Salivary Antihemostatic Components in Blood Feeding by Triatomine Bugs (Heteroptera). *J. Med. Entomol.* 35: 599–610.

- Ribeiro JMC, Schwarz A, Francischetti IMB 2015. A Deep Insight Into the Sialotranscriptome of the Chagas Disease Vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). *J. Med. Entomol.* 52: 351–358.
- Sant’Anna MRV, Diotaiuti L, Figueiredo Gontijo A De, Figueiredo Gontijo N De, Pereira MH 2 1. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J. Insect Physiol.* 47: 1459–1465.
- Sant’Anna MRV, Soares AC, Araujo RN, Gontijo NF, Pereira MH 2 17. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. *J. Insect Physiol.* 97: 20–26.
- Schmaier AA, Stalker TJ, Runge JJ, Lee D, Nagaswami C, Mericko P, Chen M, Cliché S, Gariépy C, Brass LF, Hammer DA, Weisel JW, Rosenthal K, Kahn ML 2011. Occlusive thrombi arise in mammals but not birds in response to arterial injury: evolutionary insight into human cardiovascular disease. *Blood* 118: 3661– 3669.
- Schmidt JO, Dorn PL, Klotz SA 2020. Developmental and Reproductive Plasticity in the Kissing Bug *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae). <https://doi.org/10.2317/0022-8567-93.1.14> 93: 14–23.
- Schofield CJ 1994. Triatominae: biology & control. *Triatominae Biol. & Control.*
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110: 88–100.
- Schofield CJ, Williams NG, Marshall TFDC 1986. Density-dependent perception of triatomine bug bites. <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1986.11812028> 80: 351–358.
- Schuh RT, Cobben RH 1979. Evolutionary Trends in Heteroptera. Part II. Mouthpart-Structure and Feeding Strategies. *Syst. Zool.* 28: 653.
- Schaub GA. Parasite-host interrelationships of *Blastocrithidia triatomae* and triatomines. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 622-632, 1988.
- Silva IG da, Silva HHG da 1988. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos: II. *Rhodnius neglectus* lent, 1954 (Hemiptera, reduviidae). *Rev. goiana med:* 29–37.
- Smith JJB 1979. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *exp. Biol* 8: 93–104.

- Soares AC, Araújo RN, Carvalho-Tavares J, Gontijo N de F, Pereira MH 2014. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitol. Int.* 63: 229–236.
- Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo N de F, Santos VC dos, Teixeira MM, Pereira MH 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J. Insect Physiol.* 52: 468–472.
- Taneja J, Guerin PM 1995. Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. *J. Comp. Physiol. A* 1995 1764 176: 455–464.
- Taneja J, Guerin PM 1997. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *J. Comp. Physiol. A* 1997 1811 181: 21–34.
- Weng X, Cloutier G, Pibarot P, Durand LG 1996. Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood. *Biorheology* 33: 365–377.
- Wenk P 1953. The Head of *Ctenocephalides canis*. *Zool. Jahrbucher* 73.
- Wigglesworth VB 1940. Local and General Factors in the Development of Pattern in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 17: 180–201.
- Wigglesworth VB, Gillett JD 1934. The Function of the Antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the Mechanism of Orientation to the Host. *J. Exp. Biol.* 11: 120–139.
- Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak KJ, Heinze G 2003. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp. Physiol.* 88: 431–440.
- Windberger, U., Baskurt, O.K., 2007, Comparative hemorheology, In: Oguz K. Baskurt, M.R.H., Michael W. Rampling and Hebert J. Meiselman (Ed.) Handbook of hemorheology and hemodynamics. IOS Press, Amsterdam, pp. 267-288.
- Zeledón R, Alvarado R, Jirón LF 1977. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* 34: 65–77.