



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



Luiza Rodrigues Moreira Guerra

**PADRÃO DE SALIVAÇÃO DE *CIMEX LECTULARIUS* (HEMIPTERA:CIMICIDAE)
DURANTE AS FASES DA HEMATOFAGIA NA PELE DO HOSPEDEIRO
VERTEBRADO**

Belo Horizonte
2020

Luiza Rodrigues Moreira Guerra

**PADRÃO DE SALIVAÇÃO DE *CIMEX LECTULARIUS* (HEMIPTERA:CIMICIDAE)
DURANTE AS FASES DA HEMATOFAGIA NA PELE DO HOSPEDEIRO
VERTEBRADO**

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

Área de concentração: Entomologia

Orientadora: Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Co-orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira

Belo Horizonte
2020

- 043 Guerra, Luiza Rodrigues Moreira.
Padrão de salivação de *Cimex lectularius* (Hemiptera:Cimicidae) durante as fases da hematofagia na pele do hospedeiro vertebrado [manuscrito] / Luiza Rodrigues Moreira Guerra. - 2020.
64 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa. Co-orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. *Cimex lectularius*. 3. Salivação. 4. Microscopia Intravital. 5. Eletromiografia. I. Pessoa, Grasielle Caldas D'Ávila. II. Pereira, Marcos Horácio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

408/2020/06
entrada
1º/2018
2018653711

Luiza Rodrigues Moreira Guerra

Às dez horas do dia 21 de fevereiro do ano de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Padrão de salivação de *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) durante as fases da hematofagia na pele do hospedeiro vertebrado”** área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Grasielle Caldas D'Avila Pessoa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Grasielle Caldas D'Avila Pessoa	UFMG	APROVADO
Dra. Adriana Coelho Soares	UNA-BH	APROVADO
Dr. Theo Rolla Paula Mota	UFMG	APROVADO
Dr. Marcos Horácio Pereira	UFMG	APROVADO

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	INCORPORAR AS SUGESTÕES APRESENTADAS PELA BANCA PRINCIPALMENTE EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.

Dra. Grasielle Caldas D'Avila Pessoa
(Orientadora)

Dra. Adriana Coelho Soares

Dr. Theo Rolla Paula Mota

Dr. Marcos Horácio Pereira
(Coorientador)

Prof. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Ao meu avô José Antônio Moreira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Renilde Moreira, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas até aqui vencidas, pelo carinho incondicional e pelo exemplo de luta e superação que representa. Aos meus avós, Lucília e José Moreira, pelo amor, apoio e por sempre acreditarem (saudades eternas!). Aos meus familiares, por toda contribuição.

Ao Caio, pela cumplicidade, amor e apoio em todos os momentos, por ser essa pessoa tão especial, sempre me encorajando a superar cada desafio, meu companheiro da vida.

Às minhas grandes amigas, em especial Luiza e Lara, sempre presentes e essenciais na minha vida e em cada conquista.

A minha orientadora, professora Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, não só pela oportunidade e orientação, mas também pelo carinho, atenção e apoio em todos os momentos. Além disso, pela dedicação e disponibilidade em me ajudar durante todos os processos de aprendizado, a quem posso chamar de “mãe científica”.

Ao meu coorientador, Marcos Horácio Pereira, que foi meu braço direito nos experimentos, com quem eu pude aprender imensamente e que sem ele não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço pelas ótimas ideias, pela disponibilidade, persistência e atenção.

A toda a equipe LFIH. Aos professores, Nelder, Ricardo, Maurício e Léo, pelas discussões e troca de experiências. Ao César Nonato, por toda contribuição, disposição e conversas. Ao Pedro Horta Andrade, pela grande ajuda e por ser sempre prestativo e comprometido. Em especial, à Luísa Lara, minha “irmã científica”, pela convivência, colaboração, aprendizados, carinho e amizade, durante todo esse tempo, e que vai persistir por muito. Aos amigos, por sempre tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e divertido possível, principalmente, a Natália, Denise, Jéssica e Gabriel - amigas que vou levar para a vida!

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, à Sumara e Sibebe, pela disponibilidade, atenção e auxílio. Aos professores do Departamento de Parasitologia, pela grande contribuição na minha formação pessoal e profissional. E aos membros da banca examinadora, Theo Mota, Adriana Soares e Gabriel Cerqueira, pelas contribuições ao trabalho.

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

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

RESUMO

As infestações por *Cimex lectularius* (Hemiptera:Cimicidae), apesar de subnotificadas, vêm aumentando nos últimos anos, em grande parte do mundo, configurando-se como uma importante praga urbana sem sinais de reversão. Os problemas de saúde provocados por estes insetos, popularmente conhecidos como percevejos de cama, estão diretamente associados ao hábito hematofágico obrigatório e à antropofilia. Além do intenso prurido, as picadas dos cimicídeos podem desencadear reações alérgicas em resposta aos componentes salivares depositados na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Embora a saliva desses insetos seja indispensável em tais processos, não existem estudos sobre o processo de salivação desses, sendo este o objeto de estudo do presente trabalho. Para tal, fêmeas de *C. lectularius* (7 dias em jejum) foram alimentadas em camundongos *hairless*, sendo o perfil de salivação investigado através da microscopia intravital e eletromiograma da bomba cibarial. Referindo-se à caracterização do processo alimentar observou-se que os cimicídeos canularam tanto as arteríolas (59,7%) quanto as vênulas (43,2%). O momento inicial de canulação do vaso sanguíneo provoca uma contração transitória da parede do mesmo, seguida de constante pulsação, observando-se vasodilatação ao final do repasto sanguíneo. As hemorragias foram observadas nas arteríolas e nas vênulas, ocorrendo logo após a retirada das peças bucais do vaso sanguíneo canulado. A utilização da microscopia intravital em simultâneo ao eletromiograma da bomba cibarial, confirmou que os sinais elétricos identificados durante o ingurgitamento, são referentes à contração dos músculos associados à parede da bomba cibarial. A partir da marcação do conteúdo das glândulas salivares principais de *C. lectularius* com Laranja de Acridina, observou-se que os cimicídeos salivam durante toda a alimentação, contudo, de maneira distinta nas fases de sondagem e ingurgitamento. Na fase de sondagem, a saliva é liberada continuamente e em maior quantidade. Diferentemente, na fase de ingurgitamento, a saliva é liberada em pequenas quantidades e de forma irregular, principalmente na parede do vaso sanguíneo, próximo à região de inserção das peças bucais. Além disso, durante a fase de ingurgitamento, a sucção do sangue ocorre de forma independente à liberação de saliva.

Palavras-chave: *Cimex lectularius*. Hematofagia. Salivação. Microscopia intravital. Eletromiograma.

ABSTRACT

Infestations by *Cimex lectularius* (Hemiptera:Cimicidae), although underreported, have been increasing in recent years in much of the world, becoming an important urban plague without signs of reversion. The health problems caused by these insects, popularly known as bed bugs, are directly associated with the mandatory hematophagous habit and anthropophilia. In addition to the intense itching, the bites can trigger allergic reactions in response to the salivary components deposited on the host's skin during the blood meal. Although cimicid saliva is indispensable in hematophagy, there are no studies on the salivation process of these insects, which is the object of study in the present work. For this, females of *C. lectularius* (7 days fasting) were fed on hairless mice, and the salivation profile was investigated through intravital microscopy and electromyogram of the cibarial pump. Referring to the characterization of the feeding process, it was observed that the cimicids cannulated both arterioles (59.7%) and venules (43.2%). The initial moment of cannulation of the blood vessel causes a transient vessel contraction, followed by vibration of their wall and a progressive increase of vessel diameter, presented a crisp vasodilation at the end of the blood meal. Hemorrhages were observed in both arterioles and venules, occurring shortly after the removal of the mouthparts of the cannulated blood vessel. The use of intravital microscopy simultaneously with the electromyogram of the cibarial pump, confirmed that the electrical signals identified during engorgement phase are related to the contraction of the muscles associated with the wall of the cibarial pump. From the marking of the content of the main salivary glands of *C. lectularius* with 0.05% Acridine Orange, it was observed that the cimicids salivate throughout the blood feeding, however, with distinct profile in the probing and engorgement phases. In the probing phase, saliva is released continuously and in greater quantity. In contrast, in the engorgement phase, saliva is released in small quantities at irregular intervals, mostly just near the cannulated vessel wall. In addition, during the engorgement phase, blood intake by the insects can occur independently of the release of saliva.

Keywords: *Cimex lectularius*. Haematophagy. Salivation, Intravital microscopy. Electromyogram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Distribuição mundial das infestações por *Cimex lectularius* (círculos e áreas vermelhos) e *Cimex hemipterus* (círculos e áreas verdes). As áreas em vermelho com linhas pretas quadriculadas representam locais onde a infestação por *Cimex lectularius* causou grandes impactos econômicos e em saúde pública. Nas áreas em amarelo a espécie de *Cimex* não foi identificada. Adaptado de Zorilla-Vaca et al. 2015 2
- Figura 2 - Morfologia de *Cimex lectularius* - vista dorsal. Adaptado de cimexstore.co.uk . 6
- Figura 3 - Ciclo biológico de desenvolvimento de *Cimex lectularius* (adaptado de resistenciareckandroll.wordpress.com), destacando marcado dimorfismo sexual dos adultos. Seta branca indicando o órgão copulatório - parâmero - do macho de *Cimex lectularius* 7
- Figura 4 - Reações alérgicas provocadas pelas picadas de percevejos de cama no rosto, pescoço, colo e ombro. Foto: Grasielle Pessoa 11
- Figura 5 - Desenho esquemático do aparato alimentar de *Cimex lectularius*: (A) posição das peças bucais na pele do hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo; e (B) vista lateral do fascículo durante a hematofagia. A maxila (Mx.) direita (com extremidade mais extensa e em formato de J) perpassa sobre a maxila esquerda (com extremidade mais curta e em forma de ponta de lança), formando uma boca funcional (Bf.) na ponta interna da maxila esquerda. As mandíbulas (Md.) direita e esquerda, com pontas serrilhadas, aparecem uma de cada lado do feixe maxilar, se estendendo ao nível da ponta da maxila esquerda. Adaptado de Dickerson & Lavoipierre 1959 14
- Figura 6 - Anatomia interna da parte anterior de *Cimex lectularius* destacando os componentes do aparato alimentar: (A) vista dorso-ventral e (B) vista anterolateral. Adaptado de Usinger 1966 15
- Figura 7 - Glândulas salivares principais de *Cimex lectularius* (indicadas pelas setas), destacando o formato oval e coloração alaranjada devido à presença de nitroforina. Foto: Luiza Lara 16
- Figura 8 - Sistema de alimentação artificial das fêmeas de *Cimex lectularius*, destacando-se a membrana utilizada na mamadeira de vidro (seta amarela) 24

- Figura 9 - Fêmea de *Cimex lectularius* imobilizada com auxílio de uma tira de esparadrapo fixada em massa de modelar 26
- Figura 10 - Análise de imagens pelo programa Fiji Image J, a partir dos vídeos obtidos nos experimentos com microscopia intravital. Imagem da microcirculação da pele da orelha (à esquerda) mostrando a área selecionada para análise (seta preta). Os resultados (à direita) indicam a variação de pixels da área delimitada ao longo do tempo. Os valores da densidade integrada (círculo vermelho) foram utilizados para plotagem dos gráficos 27
- Figura 11 - Representação esquemática da técnica de microscopia intravital simultânea ao monitoramento elétrico da bomba cibarial durante alimentação dos cimicídeos na pele da orelha do camundongo *hairless* anestesiado 28
- Figura 12 - Fases da alimentação de fêmeas de *Cimex lectularius* na microcirculação da pele da orelha do camundongo *hairless* observadas através de microscopia intravital: (A) logo após a picada (13,6 seg.); (B) início da fase de sondagem (41,6 seg.), apresentando movimentos oscilatórios do fascículo em várias direções no tecido; (C) início da fase de ingurgitamento (64,0 seg.), pouco depois da inserção das peças bucais na luz da arteríola, demonstrando uma contração transitória da mesma; (D) momento da fase de ingurgitamento (482,9 seg.), no qual se observa o fascículo no sítio alimentar. Legenda: P, probóscide; F, fascículo; SA, sítio de alimentação; A, arteríola; V, vênula. Considerou-se o momento da picada igual ao tempo 0 31
- Figura 13 - Hemorragia observada logo após a retirada das peças bucais de *Cimex lectularius* da arteríola da pele da orelha de camundongos *hairless*, observada através da técnica de microscopia intravital: (A) final da fase de ingurgitamento (189,05 seg.); (B) logo após a retirada das peças bucais do vaso canulado (193,55 seg.); (C) região adjacente ao sítio de alimentação com extravasamento de sangue (círculo preto) (195,53 seg.). Legenda: H, hemorragia; F, fascículo; SA, sítio alimentar; A, arteríola; V, vênula. Tempo 0 = momento da picada 32
- Figura 14 - Análise do eletromiograma da bomba cibarial de uma fêmea de *Cimex lectularius*, alimentada em uma vênula da pele da orelha de camundongo, utilizando o programa “Barbeiro.m” no software MATLAB: (A) sinais elétricos (mV) produzidos ao longo da alimentação do inseto; (B) detalhe da área selecionada em A (caixa vermelha), evidenciando os sinais elétricos (picos)

gerados pela atividade da bomba cibarial na fase de ingurgitamento; (C) espectro de frequência da contração da bomba cibarial, mostrando a frequência fundamental e suas frequências harmônicas (asteriscos); (D) espectrograma com a frequência fundamental e suas frequências harmônicas ao longo do tempo. Legenda: F.F., frequência fundamental; F.H., frequências harmônicas .. 33

Figura 15 - Sinais elétricos produzidos pelas contrações da bomba cibarial (linhas verdes) e representação gráfica da vibração da parede do vaso sanguíneo (linhas vermelhas), durante a ingestão de sangue por uma fêmea de *Cimex lectularius*, na pele da orelha de camundongo: (A) início da fase de ingurgitamento (seta), onde já é possível observar a correspondência entre os sinais elétricos (picos) e o movimento de retração da parede do vaso; (B) final da primeira metade do repasto sanguíneo, quando, geralmente, observam-se frequências de bombeamento mais altas e maiores amplitudes do movimento da parede dos vasos; (C) representação de um momento da segunda metade do repasto sanguíneo, quando se observa a redução da frequência e picos irregulares; (D) momento próximo ao final da alimentação, quando observam-se baixas frequências e picos irregulares com baixa amplitude 34

Figura 16 - Par de glândulas salivares principais de *Cimex lectularius* observadas sob microscópio de epifluorescência. Glândulas extraídas 24 horas após a alimentação apenas com sangue heparinizado humano (inseto controle, indicado pelas setas brancas) ou com sangue heparinizado humano acrescido de Laranja de Acridina 0,05% (inseto marcado, indicado por setas vermelhas): (A) luz visível; (B) luz azul (excitação: 450-490 nm; emissão: 535 nm) 36

Figura 17 - Fêmeas de *Cimex lectularius* observadas sob microscópio de epifluorescência (excitação: 450-490 nm; emissão: 535 nm) 24 horas após alimentação apenas com sangue heparinizado humano (inseto controle) ou com sangue heparinizado humano acrescido de Laranja de Acridina 0,05% (inseto marcado) com destaque para o tubo digestivo (vista ventral; A. inseto controle e B. inseto marcado) e olhos (vista dorsal; C. inseto controle e D. inseto marcado) 37

Figura 18 - Salivação de *Cimex lectularius* durante o repasto sanguíneo, na pele da orelha do camundongo *hairless*, observada pelo conteúdo salivar marcado com Laranja de Acridina através da microscopia intravital: (A) momento da picada e início da deposição de saliva da fase de sondagem (0 seg.); (B) intensa

liberação de saliva durante a fase de sondagem (6,47 seg.); (C) momento de canulação da vênula e início da fase de ingurgitamento (17,47 seg.); (D) primeira metade da fase de ingurgitamento, exibindo nítida redução da fluorescência nas regiões do tecido sondado pelo inseto (216,83 seg.); (E) segunda metade da fase de ingurgitamento, evidenciando um aumento da intensidade de fluorescência na região próxima a parede do vaso sanguíneo no sítio alimentar (383,90 seg.); (F) final da alimentação, logo após a retirada das peças bucais, mostrado fluorescência próxima a parede externa do vaso canulado (521,66 seg.). Legenda: P, probóscide; F, fascículo; A, arteíola; V, vênula; PPS, região da pele sondada previamente pelo inseto 39

Figura 19 - Análise da densidade integrada de uma área (4,7 mm²) da pele do hospedeiro, circundante ao sítio de alimentação de *Cimex lectularius* com saliva marcada com o fluorocromo Laranja de Acridina 0,05%. (A - C): mediana da densidade integrada (DI) de cada uma das 132 subáreas (0,036 mm²) correspondendo a 1ª metade, 2ª metade e do período do total da fase da 1ª sondagem (A), da 2ª sondagem (B) e do ingurgitamento (C); (D): delimitação das regiões onde ocorreu deposição da saliva sobre a foto do momento da maior fluorescência da pele do hospedeiro (B = final da 2ª sondagem), mostrando no detalhe (foto menor) a disposição espacial das 132 subáreas utilizadas na análise 41

Figura 20 - Distribuição da saliva (deposição e difusão) na pele da orelha de camundongo durante a alimentação de *Cimex lectularius*: (A): perfil da somatória da densidade integrada (DI) ao longo da alimentação, referente a área total e as áreas de salivacção e adjacentes, e linhas vermelhas destacando alguns tempos de cada fase [1 - picada (0,0 seg.), 2 - final 1ª sondagem (12 seg.), 3 - início 2ª sondagem (32,9 seg.), 4 - início ingurgitamento (39,9 seg.), 5 - final da alimentação (397,7 seg.)]; (B - E): gráficos de superfície mostrando os valores da DI das 132 subáreas da pele do hospedeiro, circundante ao sítio de alimentação do inseto no final da 1ª sondagem (B), no final da 2ª sondagem (C), após 100 segundos do início do ingurgitamento (D) e no final do ingurgitamento (E) 43

Figura 21 - Deposição de saliva na pele da orelha de camundongo, associado aos registros da vibração da parede do vaso canulado e do eletromiograma da bomba cibarial durante a alimentação de *Cimex lectularius*: (A) momentos de deposição

de saliva na pele durante a fase de ingurgitamento (a = 8,8 seg.; b = 69,9 seg.; c = 206,7 seg.; d = 282,1 seg.); (B) perfil de salivacão monitorado pela fluorescência [valor densidade integral da área selecionada pelo retângulo amarelo (2,1 mm²)] durante a fase de ingurgitamento ao longo do tempo - o valor da fluorescência apresentou oscilações, evidenciada pela largura da linha azul em decorrência a vibração da parede do vaso, cada ponto da linha vermelha representa a média da fluorescência dos 30 frames subsequentes (~ 1 segundo de observação); (C) sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial (eletromiograma) em um período de selecionado (barra vermelha), indicando que não houve interrupção da alimentação do inseto durante a deposição de saliva próximo a parede do vaso, evidenciado pelo aumento da fluorescência nesta região da derme 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Alterações nos vasos sanguíneos da microcirculação da pele da orelha de camundongos *hairless* desencadeadas pelo processo alimentar de fêmeas de *Cimex lectularius*, avaliadas por microscopia intravital, no início do ingurgitamento e logo após a retirada das peças bucais da pele do camundongo 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- Graus Célsius
%	- Por cento
CEUA	- Comitê de Ética no Uso de Animais
CO ₂	- Dióxido de carbono
Hz	- Hertz
DDT	- Dicloro-Difenil-Tricloroetano
HRS/J	- camundongos <i>Mus musculus</i> /Linhagem <i>hairless</i>
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
IntDen	- “Densidade integrada” do inglês “Integrated Density”
kg	- Quilogramas
LA	- Laranja de Acridina
mg	- Miligramas
min	- Minutos
mL	- Mililitros
mm	- Milímetros
nm	- Nanômetros
mV	- Milivolts
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NP	- Nitroforina
N.S.	- Não significativo
uL	- Microlitros
µm	- Micrômetros
pH	- Potencial de Hidrogênio
seg.	- Segundos
UV	- Ultravioleta
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO	1
1.1 -	Cimicídeos: aspectos gerais	1
1.2 -	Morfologia e ecologia dos cimicídeos	6
1.3 -	Importância médica e econômica	9
1.4 -	Hematofagia nos cimicídeos	12
1.5 -	Componentes salivares dos cimicídeos e ação no processo alimentar	16
1.6 -	Processo alimentar dos cimicídeos – microscopia intravital e eletromiograma da bomba cibarial	18
2 -	JUSTIFICATIVA	21
3 -	OBJETIVOS	22
3.1 -	Objetivo geral	22
3.2 -	Objetivos específicos	22
4 -	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 -	Material biológico	23
4.1.1 -	Insetos utilizados	23
4.1.2 -	Hospedeiro mamífero	23
4.2 -	Marcação do conteúdo das glândulas salivares de <i>Cimex lectularius</i>	24
4.3 -	Caracterização do padrão de salivação e do processo alimentar de <i>Cimex lectularius</i> em camundongos <i>hairless</i> por microscopia intravital	24
4.4 -	Análise das imagens obtidas nos experimentos de microscopia intravital	26
4.5 -	Eletromiograma da bomba cibarial	27
4.6 -	Análise dos dados obtidos nos experimentos de eletromiograma da bomba cibarial	28
4.7 -	Aspectos éticos	29
4.8 -	Análise estatística	29
5 -	RESULTADOS	30
5.1 -	Caracterização do processo alimentar de <i>Cimex lectularius</i> e alterações na microcirculação da pele da orelha de camundongos <i>hairless</i>	30
5.2 -	Marcação do conteúdo das glândulas salivares de <i>Cimex lectularius</i> com fluorocromo Laranja de Acridina	36

5.3 -	Descrição do padrão de salivação de <i>Cimex lectularius</i> durante o processo alimentar na orelha de camundongos <i>hairless</i>	37
6 -	DISCUSSÃO	46
7 -	CONCLUSÕES	55
8 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cimicídeos: aspectos gerais

A família Cimicidae, ordem Hemiptera, compreende 6 subfamílias, 24 gêneros e 110 espécies, sendo a grande maioria relacionada exclusivamente a morcegos e aves (Forattini 1990, Henry 2009, Balvín et al. 2012). Até o presente momento, apenas um gênero está associado aos humanos, denominado *Cimex*, com duas principais espécies permanentemente reconhecidas como antropofílicas: *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) e *Cimex hemipterus* (Fabricius 1803).

C. lectularius, conhecido por percevejo de cama comum, está presente em todo mundo, à exceção da Antártida. Entre os seus hospedeiros, além do homem, encontram-se galinhas, morcegos e outros animais domésticos. Diferentemente, *C. hemipterus*, conhecido por percevejo de cama tropical, apresenta distribuição limitada às áreas tropicais. Seus hospedeiros incluem além do homem, morcegos, aves e animais silvestres (Fig. 1) (Usinger 1966, Zorilla-Vaca et al. 2015). Contudo, é válido mencionar que a espécie *Leptocimex boueti* (Brumpt 1910), primariamente associada a morcegos, também se alimenta regularmente de humanos, porém, com menor importância epidemiológica já que está restrita a habitações na região da África Ocidental (Forattini 1990, Usinger 1966).

Os cimicídeos representam um importante grupo de ectoparasitos temporários devido ao seu hábito alimentar hematofágico obrigatório e antropofilia. Por um longo período de tempo, acreditou-se que os morcegos eram os hospedeiros ancestrais dos percevejos de cama, e que a origem da associação com os seres humanos tivesse ocorrido quando os homens primitivos e morcegos coabitavam as cavernas na região do Mediterrâneo (Usinger 1966, Booth et al. 2019). No entanto, estudos recentes demonstraram que a evolução das espécies de cimicídeos que ectoparasitam o homem ocorreu em eventos independentes, antes mesmo da presença humana e dos quirópteros nas cavernas (Booth 2019, Roth et al. 2019). Roth e colaboradores (2019) sugerem que *C. hemipterus* tenha como hospedeiro primitivo os pássaros. Diferentemente, *C. lectularius* teria os morcegos como hospedeiros primitivos, apresentando atualmente duas linhagens distintas: uma associada aos morcegos e outra aos humanos.

A partir da década de 1950, as infestações reduziram drasticamente devido a melhorias nas condições habitacionais, sanitárias e sociais da população, associadas a introdução e utilização em larga escala dos inseticidas sintéticos, como o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), adotados naquela época para o controle de mosquitos, pulgas, dentre outros. Dessa forma, os percevejos de cama permaneceram incomuns, especialmente nos países desenvolvidos, até a década de 1980 (Romero et al. 2007).

A partir da década de 1990 observou-se a ressurgência de tais insetos em diferentes partes do mundo, especialmente nos Estados Unidos e Europa, tornando-se cada vez mais comum com o passar dos anos (Romero et al. 2007, Potter et al. 2008, Potter et al. 2010, Dang et al. 2017). No começo do século XXI, as infestações ascendiam de forma exponencial em todo o planeta, mas sobretudo, nos Estados Unidos, no continente Europeu e Australiano. Atualmente, estima-se um aumento global de 100 a 500% da população desses insetos a cada ano (Lai et al. 2016). Em todos os países infestados, a presença dos percevejos de cama ocorre intensamente em hotéis, motéis, residências, repúblicas estudantis, abrigos públicos, escolas, asilos, hospitais, presídios, navios, cinemas, dentre outros (Hwang et al. 2005, Potter et al. 2010). Nesse cenário, os cimicídeos têm sido considerados uma praga urbana emergente, não demonstrando sinais de reversão, principalmente devido a elevada resistência desses insetos aos inseticidas disponíveis para controle (Boase 2001, Romero et al. 2010, Zorilla-Vaca et al. 2015, Dang et al. 2017).

Muitas hipóteses podem estar relacionadas com a ressurgência dos cimicídeos a partir do final do século XX, destacando-se: i) aumento da densidade populacional associado ao crescimento do turismo internacional; ii) aumento do comércio de móveis usados, utilizados como abrigos pelos percevejos de cama, uma prática bem comum na Europa e nos Estados Unidos (Szalanki et al. 2008); iii) elevadas taxas de migração dos cimicídeos por dispersão passiva; iv) as lacunas de conhecimento sobre os Cimicidae por parte da comunidade científica e/ou dos profissionais controladores de pragas urbanas (Cooper & Harlan 2004, Doggett et al. 2004, Reinhardt & Silva-Jothy 2007); v) declínio no nível de conhecimento popular durante os anos de baixa infestação (Reinhardt et al. 2008); vi) mudanças nas práticas de controle químico, devido às regulações de uso e marketing dos inseticidas (Doggett et al. 2004) e; 7) a resistência dos percevejos de camas aos inseticidas disponíveis (Dang et al. 2017).

Finalmente, vale destacar que o quadro atual da infestação pelos cimicídeos se mostra bem diferente do passado. A presença de *Cimex* como uma das principais pragas urbanas nos países desenvolvidos revela a limitação da condicionante “condições precárias de habitação e higiene” para presença dos percevejos de cama no intradomicílio (Potter et al. 2010).

No Brasil, o relato mais antigo da presença de percevejos de cama data de 1930, tendo sido reportada a presença de *C. hemipterus* no Rio de Janeiro e *C. lectularius* em São Paulo (Pinto 1930). Em seguida, Blatchley (1934) relatou ter observado *C. lectularius* em São Paulo. Em 1940, Costa Lima (1940) afirmou ser *C. hemipterus* a espécie encontrada com mais frequência no Brasil, inclusive nos centros mais populosos, enquanto *C. lectularius* era encontrado com maior abundância em São Paulo e nos Estados do Sul, devido provavelmente à intensa imigração europeia nesta região no período relacionado.

A partir da década de 1940, com a introdução dos inseticidas sintéticos no país para o controle dos vetores de Febre Amarela, Dengue, Malária e Doença de Chagas, observou-se o controle indireto das infestações por percevejos de cama, reduzindo-as drasticamente (Negromonte et al. 1991). Após esse período, Nagem & Williams (1992), em 1985, detectou a presença de *C. lectularius* em 11 dos 14 municípios que compunham a região metropolitana de Belo Horizonte, sendo que tal observação foi indiferente quanto ao nível socioeconômico das habitações visitadas. Negromonte e colaboradores (1991), em trabalho realizado em 1989 em uma comunidade do bairro Gorduras, Belo Horizonte (MG), observaram 7,16% de habitações infestadas por *C. lectularius*.

No período de 2004 a 2009, Nascimento et al. (2013) descreveram 369 infestações por cimicídeos, em aproximadamente 40% dos municípios que constituem a região metropolitana de São Paulo/SP (325 provenientes na capital e o restante em municípios vizinhos). As residências se mostraram mais infestadas (68,05%) do que os estabelecimentos comerciais e/ou de serviços (31,95%). Apesar das infestações por cimicídeos em São Paulo apresentarem uma correlação positiva com os padrões socioeconômicos mais elevados, os autores não descartaram infestações nas regiões menos favorecidas. Nesse estudo, *C. lectularius* foi a espécie predominante (92,25%), enquanto *C. hemipterus* foi apontado em apenas um registro (0,35%), sendo que 4,58% dos espécimes não foram identificados.

Araújo et al. (2009) encontraram, em 2007, alta infestação de *C. lectularius* em duas residências da região metropolitana de Belo Horizonte (nos bairros Vila Maria - antigo bairro Gorduras - e Jardim Teresópolis) e no município de Betim (MG).

Júnior e colaboradores (2015) relataram uma infestação por *C. lectularius* na Escola Estadual de Duas Barras (Rio de Janeiro). Os funcionários da escola informaram que os insetos foram observados pela primeira vez no verão de 2013, durante o dia, sendo facilmente visualizados nas paredes, banheiros, depósito e cozinha. Estes funcionários afirmaram ainda que, psitacídeos comumente construíam ninhos no forro do estabelecimento e que, mesmo na ausência das aves, em fevereiro de 2014, a visualização dos insetos foi constante, principalmente

nas horas mais quentes do dia. O forro do estabelecimento foi inspecionado pelos agentes de saúde e constatou-se o acúmulo de terra, penas características de psitacídeos, pedaços de papel e outros materiais e detritos, onde foram coletados inúmeros exemplares de *C. lectularius*. Foi comum, entre estudantes e funcionários da escola, relatos de irritação e coceira em função da picada dos cimicídeos, sendo que alguns precisaram ser medicados em função de severas reações alérgicas.

Bernardes Filho e autores (2015) caracterizaram dois casos de pacientes apresentando dermatites causadas por picadas de percevejos de cama no Rio de Janeiro em 2013. No primeiro relato, o início das lesões coincidiu com a mudança para uma nova residência no bairro da Lapa. Já no segundo, as dermatites começaram alguns dias após o paciente se mudar para um hotel no bairro do Catete. Em ambos os casos, os espécimes coletados eram *C. hemipterus*, afirmando a ocorrência “silenciosa” de tais insetos no Estado.

Lage (2014) descreveu infestações por *C. lectularius* em São Paulo, no período de 2013 a 2014, tanto na capital (quatro residências) quanto no Oeste do Estado (sete alojamentos dos presídios de Mirandópolis e Valparaíso). À exceção dos presídios, os demais locais de coleta não demonstraram ser de baixa renda ou higiene precária. Nos presídios, as infestações se mostraram mais altas, indicando serem antigas, suspeitando-se de frequentes reinfestações por se tratar de regime semiaberto. Através de uma plataforma online, estabelecida em parceria com o Instituto Biológico de São Paulo, foi possível acessar a 33 notificações de residências infestadas por cimicídeos.

Mais recentemente, entre 2013 e 2016, Silva (2017) identificou altas infestações por *C. lectularius* em abrigos públicos da prefeitura de Belo Horizonte/MG, resistentes a todos os inseticidas recomendados para o controle químico desse inseto no Brasil. Além disso, foram descritas 16 ocorrências de infestação domiciliar por *C. lectularius* em Belo Horizonte, no período de 2014 e 2015, realizada pelos moradores ao Controle de Zoonose do município.

Há uma percepção difundida no Brasil de que o número de infestações por cimicídeos vem apresentando crescimento contínuo. Contudo, de fato, observa-se que a população brasileira não tem o hábito de notificar as infestações de cimicídeos em seus imóveis, principalmente devido ao desconhecimento das pessoas sobre estes insetos. Isso culmina em dados que não refletem a realidade (Bocalini 2015). Verificam-se, em sua maioria, relatos isolados, incompletos e informais, a exemplo de reclamações por hóspedes em sites de hospedagem como Booking, TripAdvisor, Airbnb, dentre outros. Somado a isso, nota-se um desconhecimento por parte dos profissionais de saúde na identificação de dermatites causadas por percevejos de cama. A inexistência de um setor público responsável pelo serviço de

controle/vigilância de cimicídeos, atrelada a publicidade negativa gerada pela presença destes insetos (principalmente no setor de hotelaria), podem ser fatores decisivos para a baixa notificação. Figueiredo (2018) propôs um “Guia de Vigilância e Controle de Percevejos de Cama” com o intuito de informar e orientar os profissionais de saúde na padronização de ações frente as infestações por tais insetos. Desta forma, sua utilização poderia oferecer elementos para a implementação de um Programa de Vigilância Entomológica voltado especificamente para os cimicídeos, resultando em fontes de dados seguras para compreensão do panorama real de infestações no ambiente urbano, em território nacional.

1.2. Morfologia e ecologia dos cimicídeos

Os cimicídeos são inseto ápteros, de tamanho reduzido, variando entre 4,0 e 6,5 mm de comprimento, quando adultos. Possuem o corpo ovalado e achatado dorso-ventralmente, com coloração marrom avermelhada, sendo densamente recoberto por cerdas, com hemiélitros curtos e reduzidos. A cabeça se apresenta curta e larga, com clipeo bem desenvolvido, onde se origina a probóscide (rosto) - curvada para a região ventral da cabeça, reta e tri-segmentada -, contendo antenas formadas por quatro segmentos. Observam-se olhos protuberantes apresentando-se sob a forma de saliências laterais cobertas de omatídeos, e sem ocelos. A região torácica apresenta-se dividida em três partes. A primeira, protórax ou pronoto, possui expansões laterais desenvolvidas e recebe a cabeça em sua margem anterior côncava. Logo após, está o mesotórax, onde se observa o escutelo, em formato triangular com o ápice voltado para a região posterior. Já o metatórax é bem delimitado na região ventral, porém, na região dorsal se encontra sob os hemiélitros sendo, portanto, bastante reduzido. Já o abdome possui onze segmentos e grande capacidade de se expandir durante a alimentação (Fig. 2) (Usinger 1966).

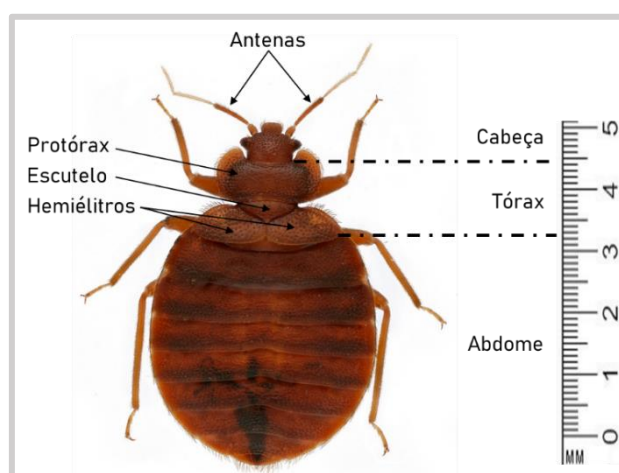


Figura 2. Morfologia de *Cimex lectularius* - vista dorsal. Adaptado de cimexstore.co.uk.

C. lectularius apresenta ciclo de vida paurometábulo, com cinco estádios ninfais, entre os estágios de ovo e adulto (Fig. 3A). O período de desenvolvimento está diretamente relacionado à temperatura, à disponibilidade de alimentação sanguínea e ao número de cópulas (Forattini 1990). À 23°C, o ciclo de vida se completa com 90 dias, porém, em temperaturas mais elevadas (ex. 28°C) esse período diminui para aproximadamente 30 dias. Em condições favoráveis, a reprodução ocorre durante todo o ano.

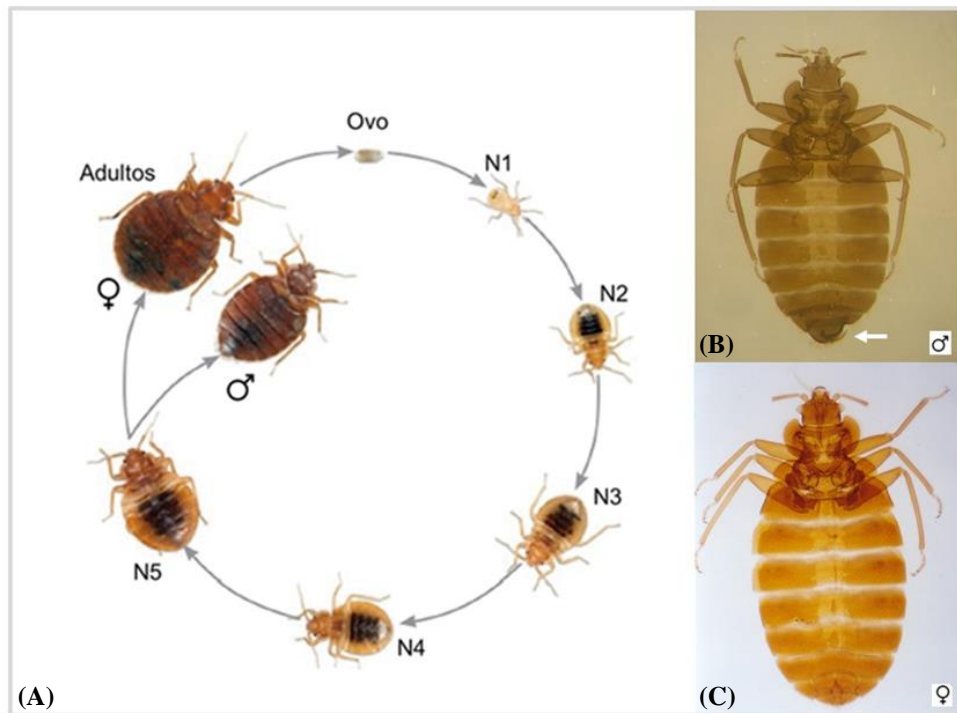


Figura 3. Ciclo biológico de desenvolvimento de *Cimex lectularius* (adaptado de resistenciarockandroll.wordpress.com), destacando marcado dimorfismo sexual dos adultos. Seta branca indicando o órgão copulatório - parâmero - do macho de *Cimex lectularius*.

As posturas ocorrem três a quatro dias após a fecundação. As fêmeas ovipõem de forma isolada, no interior dos abrigos, de 1 a 4 ovos por dia, podendo depositar de 200 a 500 ovos durante toda a sua vida (em média 86,7 dias, com apenas uma alimentação sanguínea). Os ovos são geralmente colocados isolados e aderidos ao substrato, devido à uma substância adesiva que os recobre, denominada cimento. São muito semelhantes nas duas espécies de *Cimex* associadas ao homem, tendo cerca de 1 mm de comprimento por 0,5 mm de largura. Logo após a postura, os ovos apresentam coloração branco-perolada, mudando de tonalidade com o passar do tempo, apresentando-se branco-amarelados próximo a eclosão. Além disso, possuem o cório distintamente reticulado e um opérculo deslocado lateralmente (Johnson 1941, Usinger 1966). Dos ovos emergem as formas imaturas, que evoluem por cinco estádios ninfais, diferindo-se dos adultos pelo seu menor tamanho, pela falta de desenvolvimento dos órgãos sexuais, menor

pilosidade corporal, pela presença de apenas dois segmentos nos tarsos e ausência de hemiélitros (Usinger 1966). Já os adultos, exibem marcado dimorfismo sexual, com a parte posterior do abdome alongada nos machos e arredondada nas fêmeas (Fig. 3B, C) (Usinger 1966). Destaca-se o modo incomum de inseminação utilizado em todas as espécies da família Cimicidae: a inseminação extragenital traumática ou integumentar, a qual é restrita a poucos artrópodes (Forattini 1990, Tatarinic et al. 2014, Reinhardt et al. 2015). Nesta modalidade de cópula, o macho perfura o abdome da fêmea, com seu órgão copulatório (parâmero) (Fig. 3B) e injeta os espermatozoides no espermalégio. Este, é um órgão feminino importante na redução do trauma físico originado pela perfuração, o qual produz uma substância cicatrizante que também auxilia na resposta imunológica contra possíveis patógenos adquiridos na cópula (Usinger 1966, Siva-Jothy et al. 2019).

Uma importante característica na biologia dos percevejos de cama é o hábito de viverem agrupados, essencial para seu desenvolvimento, alimentação e reprodução. A vida gregária pode proporcionar benefícios fisiológicos e comportamentais como: um microambiente favorável (maior umidade e termorregulação do grupo), acesso a microrganismos simbiotes, desenvolvimento mais rápido, menor risco de predação e facilidade no encontro de parceiros sexuais (Saenz et al. 2014, Balvín et al. 2019). Nos abrigos, podem ser vistos aglomerados de indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento, que se misturam às exúvias, ovos eclodidos e fezes, com os adultos representando aproximadamente 30% da colônia - dependendo das condições de temperatura do ambiente (Usinger 1966). Tais aglomerados são denominados locais de ninhada ou incubação (Usinger 1966, Forattini 1990), sendo formados, principalmente, pela atração dos insetos por um aparato de feromônios bem desenvolvido. Há de se considerar também a detecção mecânica dos outros indivíduos do abrigo, via receptores mecânicos localizados nas antenas dos cimicídeos (Reis 2010, Siljander et al. 2008, How & Lee 2010, Gries et al. 2015).

Em geral, os percevejos de cama estabelecem seus abrigos em locais secos, com pouca ou nenhuma luminosidade e umidade, permanecendo nestes lugares durante o período de inatividade alimentar. Os refúgios são geralmente próximos de onde vivem suas fontes alimentares, voltando os insetos para os abrigos logo após a alimentação. Praticamente qualquer abertura ou espaço protegido pode servir como abrigo para os percevejos de cama, tais como: fendas ou rachaduras das paredes, o interior de armários e outros móveis, cestos de roupas, colchões ou travesseiros, tábuas de pisos, quadros e carpetes, rodapés e marcos de portas, nos estrados de camas, cortinas, malas de viagem, interruptores ou tomadas, etc. Ressalta-se que as áreas com menor contato humano da casa somente são colonizadas quando há infestações mais

severas. Os cimicídeos reagem à luz, evidenciando fototaxia negativa e, por conta disso, permanecem durante o dia refugiados, saindo preferencialmente durante a noite para realizar o repasto sanguíneo. Porém, estes insetos são oportunistas, podendo se alimentar mesmo durante o dia se estiverem em jejum prolongado ou caso a fonte alimentar esteja disponível apenas neste período (Usinger 1966, Forattini 1999, Doggett et al. 2004).

Referindo-se à dispersão, os cimicídeos apresentam mobilidade reduzida destinada ao encontro e acesso das suas fontes alimentares, sendo também responsável pela disseminação dos insetos em um mesmo imóvel. Essa movimentação ativa ocorre principalmente no período noturno, sendo que as fêmeas são mais ágeis do que os machos. Em maiores distâncias, a dispersão dos percevejos de cama ocorre de forma passiva, sendo esses insetos carregados acidentalmente através de malas de viagem, roupas, móveis e outros objetos, fato que facilita a ampla distribuição destes insetos pelo mundo, podendo sobreviver por pelo menos 135 dias (4,5 meses) sem se alimentar (Forattini 1990, Cooper et al. 2015).

1.3. Importância médica e econômica

Ao lado dos insetos da subfamília Triatominae, os cimicídeos são os únicos hemípteros que despertam interesse em saúde humana devido a duas importantes adaptações evolutivas: a hematofagia obrigatória, comum a todos os gêneros de ambas as famílias, e a antropofilia, compartilhada apenas por algumas espécies (Forattini 1990).

Tais insetos exibem características biológicas fundamentais e comuns a vetores de diferentes patógenos, a saber: a hematofagia obrigatória; o fato de se alimentarem de sangue em todos os estágios evolutivos; a possibilidade de uma colônia se alimentar de diversos hospedeiros transitórios; e a suscetibilidade de infecção a um grande número de patógenos em condições laboratoriais. Contudo, a transmissão natural de patógenos pelos percevejos de cama ainda é bastante discutida (Delaunay et al. 2011, Doggett et al. 2012, Zorilla-Vaca et al. 2015, Ho et al. 2016, Lai et al. 2016). *C. lectularius* e *C. hemipterus* já foram encontrados naturalmente infectados com *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp., *Brucella melitensis*, *Coxiella burnetii*, e *Rickettsia prowazeki* bem como, carreando os vírus da hepatite B e da imunodeficiência humana (HIV). Além disso, em condições laboratoriais, tais insetos se mostraram suscetíveis a infecção por mais de 65 espécies de microrganismos, incluindo fungos, vírus, bactérias e protozoários (Delaunay et al. 2011, Doggett et al. 2012, Zorilla-Vaca et al. 2015). As possíveis formas de transmissão ao

hospedeiro seriam pela saliva, pelas fezes e pelo rompimento dos insetos (frágeis quando ingurgitados) no sítio de picada e mucosas.

Até o momento não existem evidências concretas comprovando a transmissão natural de patógenos por *C. lectularius*. O fato de patógenos permanecerem vivos/viáveis durante um período de tempo variável no organismo dos percevejos de cama, após a infecção experimental, não significa que esses organismos sejam transmitidos por esses insetos sob circunstâncias naturais. Lai e colaboradores (2016) sugerem que os cimicídeos não sejam vetores de diferentes patógenos em condições naturais, devido à presença de fatores de neutralização - como proteases e sistema imune sempre ativo - que diminuiriam a virulência de patógenos, permitindo apenas o transporte passivo de patógenos humanos, mas não sua transmissão durante a hematofagia. Diferentemente, Ho et al. (2016) acreditam que a introdução constante de patógenos, durante a inseminação traumática, pode estimular o sistema imunológico das fêmeas e, assim, selecionar níveis mais altos de imunidade em cimicídeos, afetando a viabilidade e sobrevivência de microrganismos patogênicos.

Considerando tal pressuposto, devido à ausência de comprovação da capacidade vetorial dos cimicídeos em condições naturais, pouca importância tem sido atribuída a esses insetos. No entanto, deve-se considerar o impacto gerado na saúde física, psíquica e emocional dos indivíduos ectoparasitados, em decorrência das dermatites geradas em resposta aos componentes salivares dos cimicídeos. Na prática, as picadas dos percevejos de cama se traduzem em intenso incômodo durante o sono podendo resultar em insônia, ansiedade e estresse (Doggett et al. 2012). No caso de infestações mais severas, principalmente quando as picadas acometem crianças, indivíduos debilitados e/ou idosos, devido ao volume de sangue espoliado dos hospedeiros, os cimicídeos são suspeitos de causarem deficiências vitamínicas e anemia. Dependendo da frequência, as infestações podem comprometer o funcionamento neurocognitivo, o estado emocional, a autoestima e a rotina dos indivíduos (Reinhardt & Siva-Jothy 2007, Goddard & deShazo 2009, Doggett et al. 2012).

Apesar das picadas dos cimicídeos se mostrarem indolores, as mesmas resultam em dermatites acompanhadas de coceira, bem como, processos alérgicos de intensidades variáveis. A sintomatologia varia em decorrência do *status* imunológico do hospedeiro, do tempo de exposição às picadas e do tamanho da infestação à qual foi submetido. Os locais mais constantemente acometidos são a face, pescoço, ombros, braços e pernas. Frequentemente, observam-se lesões com padrão linear ou de agrupamento característico, causado por repetidas picadas de um único inseto, ou devido a alimentação agrupada de vários insetos nas infestações. Em pessoas nunca picadas pelos cimicídeos, as dermatites geralmente aparecem

aproximadamente 10 dias após a exposição, sendo comum observar pápulas, vesículas e/ou bolhas no sítio da picada. Diferentemente, em indivíduos já expostos, a reação cutânea pode ser quase imediata observando-se a formação de pústulas que podem estar acompanhadas de urticária generalizada, febre e mal-estar (Fig. 4). Tais dermatites podem servir como porta de entrada para infecções secundárias (Honig 1986, Goddard & deShazo 2009, Delaunay et al. 2011, Lai et al. 2016). Algumas reações sistêmicas podem ocorrer, como asma e anafilaxia, sugerindo a presença de uma hipersensibilidade mediada por IgE desencadeada devido aos componentes salivares dos cimicídeos. Leverkus e colaboradores (2006) ao tratarem um paciente que apresentava múltiplas lesões na pele em decorrência de picadas por *C. lectularius*, incriminaram uma nitroforina salivar (NP) como desencadeadora de tais reações.

O tratamento dessas dermatites consiste na aplicação tópica de corticoides para o controle da inflamação, associada a aplicação tópica de antibióticos e antissépticos para prevenir e/ou controlar infecções secundárias. Em casos graves recomenda-se a administração de anti-histamínicos (Lai et al. 2016).

Vale destacar que, em hospedeiros vertebrados menores, como morcegos e aves domésticas, a resposta às picadas dos percevejos de cama pode variar de um estado alérgico a reações de hipersensibilidade severas, podendo causar a morte do hospedeiro. Nestes hospedeiros, o desconforto causado pelos cimicídeos pode desencadear mudanças fisiológicas, diminuição do sucesso reprodutivo, bem como favorecer infecções secundárias (Reinhardt & Siva-Jothy 2007).



Figura 4. Reações alérgicas provocadas pelas picadas de percevejos de cama no rosto, pescoço, colo e ombro. Foto: Grasielle Pessoa.

Em relação aos impactos econômicos provocados pelos cimicídeos, destaca-se o elevado custo no combate das infestações, a necessidade de recurso humano especializado/capacitado para realização das ações atrelado ao monitoramento dos locais infestados (Doggett et al. 2012, Zorilla-Vaca et al. 2015). Doggett e colaboradores (2012) relataram um custo de 200 milhões de dólares à economia australiana desde o início do ressurgimento desses insetos (década 1990) até 2012. No mesmo período, os Estados Unidos gastaram aproximadamente 3 bilhões de dólares. Nesse país, estima-se que, só no ano de 2010, foram gastos 319 milhões de dólares no manejo de infestações por cimicídeos (Curl et al. 2011). Dentre os setores econômicos mais afetados pelas infestações por percevejos de cama, destaca-se a indústria hoteleira (hotéis, resorts, pousadas, etc.) que, além dos altos custos para o controle, substituição de infraestrutura infestada e pedidos de reparação monetária de hóspedes, são afetados pelos impactos negativos na sua reputação social (Reinhardt & Siva-Jothy 2007, Zorilla-Vaca et al. 2015).

1.4. Hematofagia nos cimicídeos

Os percevejos de cama são exclusivamente hematófagos em todos os estágios de vida pós-embrionário. Dessa forma, o sangue constitui sua única fonte de alimentação, indispensável para o desenvolvimento dos mesmos. Os cimicídeos saem dos abrigos e buscam a fonte alimentar geralmente no período noturno, quando as condições ambientais são mais favoráveis e o hospedeiro encontra-se em repouso (Usinger 1966).

O encontro da fonte alimentar pelos cimicídeos ocorre, principalmente, através de pistas térmicas e/ou químicas. Sensores de temperatura, presentes nas antenas desses insetos, podem detectar diferenças mínimas de 1 a 2 °C. As temperaturas acima daquelas encontradas no ambiente são consideradas atrativas, sendo que a temperatura máxima para tal é de 43 °C. Acima desse ponto, as temperaturas tornam-se repulsivas. Os percevejos de cama também são atraídos pelo dióxido de carbono (CO₂) e cairomônios (suor, secreções das glândulas sebáceas e auriculares) liberados pelo hospedeiro mamífero (Forattini 1990, Reinhardt & Siva-Jothy 2007, Siljander 2008, Kolb et al. 2009). Além disso, os cimicídeos utilizam a visão e recepção mecânica na localização dos hospedeiros, sendo a cor e textura do substrato e a presença de objetos verticais, importantes nesta busca pelas fontes alimentares (Singh et al. 2015).

Assim como os triatomíneos, os cimicídeos dispõem de um aparato bucal picador-sugador, adaptado para retirar o sangue diretamente dos vasos sanguíneos (vênulas ou arteríolas), tipo de alimentação denominada solenofagia (Dickerson & Lavoipierre 1959). A

probóscide ou lábio (aparelho bucal) engloba ventralmente o fascículo, o qual é composto por um par de mandíbulas e par um de maxilas. As mandíbulas são estruturas muito finas, com extremidade apical serrilhada, posicionadas uma de cada lado do feixe maxilar. Já as maxilas se juntam, por justaposição, formando os sulcos dos canais alimentar e salivar, e diferem em suas extremidades distais, sendo a maxila esquerda um pouco mais curta e com ponta em forma de lança, e a direita mais extensa e com ponta em formato de J (Puri 1924, Dickerson & Lavoipierre 1959) (Fig. 5B).

O processo de alimentação começa com a inserção do fascículo na pele do hospedeiro. As mandíbulas projetam-se levemente a frente das maxilas, abrindo os tecidos e orientando a direção do movimento, avançando como um único feixe altamente flexível. Esses movimentos em várias direções (fase de sondagem) cessam quando um vaso é encontrado, penetrando até o seu lúmen apenas as maxilas. Dickerson e Lavoipierre (1959) na descrição do mecanismo alimentar de *C. lectularius*, não conseguiram visualizar com nitidez os eventos que ocorrem no interior vaso durante a sucção do sangue. No entanto, estes autores acreditavam que somente a maxila direita é introduzida na luz do vaso sanguíneo, ficando as outras partes do fascículo (maxila esquerda e mandíbulas) apenas encontradas na parede do vaso. Tal inferência foi devido a visualização da disposição das peças bucais dos cimidéos, através de cortes histológicos, durante a alimentação no vaso sanguíneo. Além das peças bucais, o primeiro par de pernas também é importante no processo de alimentação, permitindo que o cimidéio se apoie na pele do hospedeiro, e introduza ou retire o fascículo de dentro do tecido. Ressalta-se que, apesar do lábio não entrar nos tecidos do hospedeiro durante a alimentação, é ele quem governa a profundidade que o fascículo pode penetrar na fase de sondagem através do seu encurtamento e/ou extensão (Fig. 5A) (Dickerson & Lavoipierre 1959).

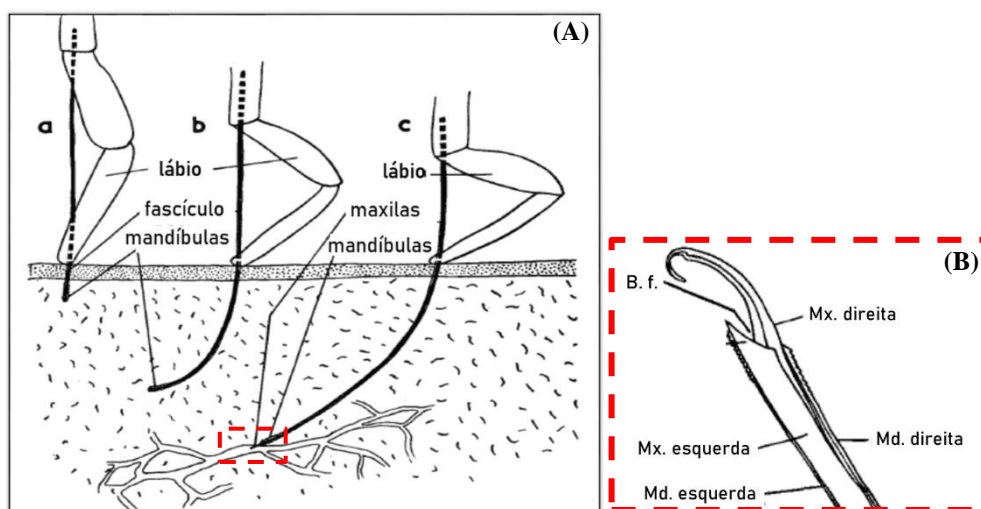


Figura 5. Desenho esquemático do aparato alimentar de *Cimex lectularius*: (A) posição das peças bucais na pele do hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo; e (B) vista lateral do fascículo durante a hematofagia. A maxila (Mx.) direita (com extremidade mais extensa e em formato de J) perpassa sobre a maxila esquerda (com extremidade mais curta e em forma de ponta de lança), formando uma boca funcional (Bf.) na ponta interna da maxila esquerda. As mandíbulas (Md.) direita e esquerda, com pontas serrilhadas, aparecem uma de cada lado do feixe maxilar, se estendendo ao nível da ponta da maxila esquerda. Adaptado de Dickerson & Lavoipierre 1959.

Após a finalização da fase de sondagem, inicia-se a fase de ingurgitamento. O sangue se desloca do canal alimentar até o tubo digestivo do cimicídeo, através da pressão negativa gerada em resposta ao funcionamento rítmico da bomba cibarial. Esta bomba é uma região do tubo digestivo com paredes espessas, associadas a uma musculatura desenvolvida (músculos dorsais e laterais) que ocupam grande parte da cabeça do inseto (Fig. 6). Quando em atividade, a musculatura constituinte da bomba cibarial se contrai e impulsiona o sangue do hospedeiro para o intestino (Usinger 1966, Araújo et al. 2006, Araújo et al. 2011). Finalizado o ingurgitamento, a bomba interrompe seu funcionamento e o inseto retira o fascículo do vaso canulado (Dickerson & Lavoipierre 1959). O tempo de ingestão do repasto sanguíneo, em *C. lectularius*, varia de 2 a 3 minutos para as ninfas jovens (1 a 4 estágio), alcançando até 5 minutos para as ninfas de quinto estágio, e decrescendo ligeiramente para os adultos, com as fêmeas atingindo o ingurgitamento mais rapidamente do que os machos (Forattini 1990). O último estágio ninfal e os adultos podem ingerir até 10 μ L de sangue por repasto, ou seja, aumentam de duas a cinco vezes seu peso corporal (7 a 10 mg), o que torna seus corpos intumescidos, com coloração modificada para um vermelho escuro. Após a alimentação, os cimicídeos se afastam dos hospedeiros procurando

esconderijos onde se abrigam, por tempo variável, até a nova alimentação (Usinger 1966, Forattini 1990, Lehane 2005).

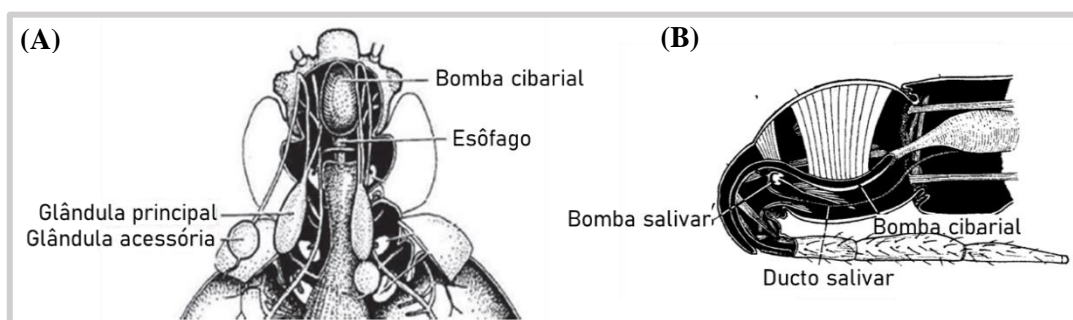


Figura 6. Anatomia interna da parte anterior de *Cimex lectularius* destacando os componentes do aparato alimentar: (A) vista dorso-ventral e (B) vista antero-lateral. Adaptado de Usinger 1966.

Normalmente, as ninfas se alimentam até 24 horas após a muda, tendo intervalos de alimentação menores do que aqueles observados nos adultos (Usinger 1966). Ninfas de *C. lectularius* que não se alimentam em até cinco dias após a eclosão geralmente morrem. A frequência dos repastos sanguíneos é regulada pela taxa de digestão sanguínea do cimicídeo, pela disponibilidade de fonte alimentar e pela temperatura ambiental (Usinger 1966, Reinhardt & Siva-Jothy 2007). Em temperaturas mais elevadas ($\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$), são observados intervalos mais curtos entre cada repasto, enquanto que, em temperaturas mais baixas ($\sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$), estes intervalos tornam-se mais longos. Colônias de *C. lectularius* mantidas em laboratório ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 60% UR) normalmente se alimentam a cada 7 dias. Já em condições naturais, para *C. lectularius*, este tempo varia entre 3 e 7 dias (Forattini 1990, Reinhardt & Siva-Jothy 2007).

Ressalta-se a relativa resistência dos cimicídeos ao jejum. Adultos já foram observados sobrevivendo sem alimentação por até 130 dias, para as fêmeas, e 142 dias, para os machos. As ninfas, por sua vez, possuem uma capacidade menor, podendo sobreviver por até 90 dias (Usinger 1966). No entanto, a ausência prolongada de um hospedeiro apropriado é desafiadora para estes insetos, uma vez que pode lhes causar dessecação, visto que retiram, do sangue ingerido, todo o líquido que necessitam para sobreviver (Forattini 1990). Para driblar tal problemática, os cimicídeos apresentam grande aptidão em reter líquidos, sendo capazes de entrar em estado de letargia e total inatividade, permanecendo, assim, no interior do abrigo até que a fonte sanguínea regresse.

Além dos componentes mencionados, *C. lectularius* possui, em seu aparato alimentar, uma bomba salivar e dois pares de glândulas salivares (Fig. 6). Estas, são compostas por um par de glândulas principais (formato oval/piriforme e coloração alaranjada) (Fig. 7) e um par de glândulas acessórias (arredondadas e coloração branca translúcida) (Fig. 6). Ambas glândulas salivares são unilobadas e se localizam em posição latero-dorsal no tórax, juntamente com seus ductos. Os ductos salivares se estendem das glândulas até a cabeça do inseto (Fig. 6), possibilitando a saída de saliva, no local da picada, pela ação da bomba salivar (Puri 1924). Destaca-se, contudo, que, embora a saliva dos cimicídeos seja indispensável para o repasto sanguíneo, não existem estudos sobre o processo de salivação desses insetos. Estudos da fisiologia de *C. lectularius* poderiam fornecer informações importantes para a compreensão da interação cimicídeo-hospedeiro vertebrado.

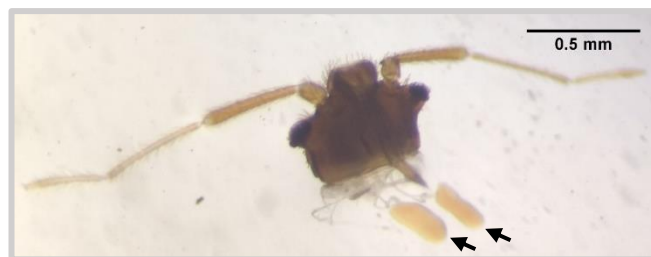


Figura 7. Glândulas salivares principais de *Cimex lectularius* (indicadas pelas setas), destacando o formato oval e coloração alaranjada devido à presença de nitroforina. Foto: Luiza Lara.

1.5. Componentes salivares dos cimicídeos e ação no processo alimentar

A capacidade de um inseto hematófago, como os cimicídeos, em ingerir sangue de um hospedeiro é o principal determinante do seu ciclo biológico e da dinâmica populacional (Pereira et al. 2006). O volume do repasto sanguíneo e o tempo necessário para completar a alimentação dependem de vários parâmetros, incluindo a morfologia do aparelho bucal do inseto, a viscosidade do sangue e o fluxo sanguíneo, que variam de acordo com a espécie do inseto, do hospedeiro e local da picada (Lehane 2005, Araújo et al. 2009). Dessa forma, os insetos hematófagos desenvolveram mecanismos a fim de facilitar o repasto sanguíneo.

O mecanismo hemostático do hospedeiro vertebrado constitui uma barreira à alimentação sanguínea dos artrópodes. Ele representa a resposta que controla a perda de sangue após a lesão de um vaso sanguíneo. Dessa forma, para contrapor as reações hemostáticas, os insetos hematófagos apresentam, na saliva, um amplo repertório de moléculas com atividades que neutralizam a hemostasia (Ribeiro 1987, Ribeiro & Francischetti 2003). Ribeiro e Garcia

(1980) constataram, pela primeira vez, utilizando como modelo o triatomíneo *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae), que a saliva de insetos hematófagos tem a capacidade de inibir a agregação plaquetária do hospedeiro, favorecendo a ingestão de sangue pelo inseto. A partir daí, foram identificados vários agentes antihemostáticos, anti-inflamatórios e imunossupressores na saliva de diferentes artrópodes hematófagos (Ribeiro & Francischetti 2003).

Na descrição do sialoma de *C. lectularius*, Francischetti e colaboradores (2010) apresentaram 46 componentes proteicos distintos, muitos com atividade antihemostática, alguns com função de defesa (incluindo possivelmente agentes antimicrobianos), e outros com papel ainda não esclarecido. Dentre as moléculas salivares isoladas e caracterizadas com ação antihemostática, destacam-se a apirase, um inibidor de fator X da cascata de coagulação e a nitroforina (Valenzuela et al. 1995, Valenzuela et al. 1996^a, Valenzuela et al. 1996b, Valenzuela & Ribeiro 1998). Essas moléculas salivares são consideradas fundamentais para os cimicídeos, visto que facilitam a localização dos vasos sanguíneos e a manutenção do fluxo de sangue durante a alimentação (Ribeiro & Francischetti 2003).

A enzima apirase tem importante papel na prevenção da agregação plaquetária, ao clivar a adenosina trifosfato e difosfato até adenosina monofosfato, já que o ADP é um importante indutor de agregação de plaquetas (Valenzuela et al. 1996^a). Como anticoagulante, *C. lectularius* possui um inibidor da ativação do fator X da cascata de coagulação, sendo que a inibição da ativação do fator X a Xa ocorre no complexo tenase e não diretamente sobre o fator Xa ativado (Valenzuela et al. 1996b). Além desses componentes salivares, vale destacar a presença de uma hemeproteína, denominada nitroforina (NP), com ação vasodilatadora e anti-agregação plaquetária (Valenzuela et al. 1995, Valenzuela & Ribeiro 1998).

As nitroforinas (NPs), são um grupo de hemeproteínas com papel de destaque na alimentação dos artrópodes hematófagos, caracterizadas primeiramente na saliva de *R. prolixus*. Produzidas nas glândulas salivares, elas são capazes de armazenar e transportar óxido nítrico (NO) destes órgãos para a pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Ribeiro & Nussenzveig 1993, Ribeiro & Walker, 1994). A identificação de uma NP semelhante às de *R. prolixus*, em *C. lectularius*, foi inicialmente descrita por Valenzuela e colaboradores (1995), por terem notado que as glândulas salivares principais deste cimicídeo apresentam tonalidade alaranjada, sugerindo a presença de uma hemeproteína (Valenzuela & Ribeiro 1998). Contudo, as NPs de *R. prolixus* diferem da NP de *C. lectularius* quanto a sua estrutura e moléculas de ligação. Enquanto as NPs de *R. prolixus* se ligam a histamina, secretada pelo hospedeiro em resposta a picada, a NP de *C. lectularius* se liga reversivelmente a duas moléculas de NO, para estabilização de NO por longos períodos (Walker 2005, De Simone et al. 2017). O NO é um

radical livre, gasoso, altamente reativo, que se liga reversivelmente ao grupamento heme das NPs, dependendo da concentração e do pH. Em pH neutro ou alcalino o NO é liberado pelas NPs, permanecendo ligado a elas em pH ácido (Ribeiro et al. 1993). Esse gás, ao ser liberado pelas NPs, é capaz de induzir a vasodilatação por longos períodos, quando em contato com o endotélio dos vasos sanguíneos do hospedeiro, tendo sua síntese mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas glândulas salivares do inseto (Ribeiro & Nussenzveig 1993, Andersen et al. 2000).

Araújo e colaboradores (2009) demonstraram que a quantidade de hemeproteínas por par de glândulas principais de *C. Lectularius* é aproximadamente o dobro daquela presente em *C. Hemipterus*. Tal fato reflete na maior capacidade de *C. Lectularius* em contrapor as atividades hemostáticas do hospedeiro vertebrado, resultando em uma maior eficiência desta espécie em relação a *C. Hemipterus* na obtenção do repasto sanguíneo.

1.6. Processo alimentar dos cimiécidos – microscopia intravital e eletromiograma da bomba cibarial

A ingestão de sangue pelos artrópodes hematófagos requer não somente superar o mecanismo hemostático do hospedeiro vertebrado, como também, a participação de uma série de estruturas relacionadas ao aparelho bucal, tais como: as glândulas salivares, a bomba salivar, a bomba cibarial, etc. Dessa forma, vários estudos a fim de se investigar o que ocorre na pele do hospedeiro vertebrado durante a picada e, o mecanismo utilizado por estes artrópodes para realizar o repasto sanguíneo, vem sendo realizados. Nesse sentido, o uso de técnicas como a microscopia intravital e o eletromiograma da bomba cibarial, permitem a investigação minuciosa da fisiologia do processo alimentar (Griffiths & Gordon 1952, Dickerson & Lavoipierre 1959, Soares et al. 2006, Araújo et al. 2009, Soares et al. 2014, Costa et al. 2016).

A microscopia intravital consiste na visualização do local de alimentação, no hospedeiro vivo, através da transiluminação do tecido, permitindo a obtenção de imagens bem detalhadas dos eventos que ali ocorrem (Dickerson & Lavoipierre 1959). Em um trabalho pioneiro, Griffiths & Gordon (1952) desenvolveram um aparato para observar detalhadamente o processo alimentar de mosquitos em roedores *in vivo*, o qual possibilitava a visualização da ejeção de saliva, pelo inseto, nos tecidos do hospedeiro. A partir daí, a técnica foi aprimorada pela utilização de equipamentos mais modernos de iluminação, visualização, gravação das imagens e *softwares* de análise de imagens, podendo ser adaptada em diferentes abordagens biológicas relacionadas à pele (Niz et al. 2019). Essa metodologia permite a caracterização dos eventos que

ocorrem em cada etapa da alimentação sanguínea, podendo ser observados no inseto (movimentação das peças bucais, salivação, etc.), e/ou no hospedeiro vertebrado (modificações ocorridas no tecido ou na microcirculação do sítio alimentar, etc.) (Soares et al. 2006, Soares et al. 2014, Costa et al. 2016). Soares et al. (2006), através da técnica de microscopia intravital, caracterizaram o padrão de salivação de *R. prolixus*, durante o processo alimentar, na pele da orelha de camundongos *hairless*, fornecendo informações importantes para a compreensão da interação triatomíneo-hospedeiro vertebrado.

Outra metodologia empregada para os estudos fisiológicos do processo alimentar é o eletromiograma. Ele permite a captura dos sinais elétricos gerados pelos artrópodes durante a alimentação, determinando precisamente as etapas e os diferentes parâmetros relacionados à hematofagia (Sant'Anna et al. 2001). Na ordem Hemiptera, essa técnica foi utilizada pela primeira vez em triatomíneos por Smith & Friend (1970) e, foi aprimorada, posteriormente, por Guarneri e colaboradores (2000). Eles registraram os sinais elétricos gerados pela contração da musculatura da bomba cibarial, para a descrição das diferentes fases do comportamento alimentar desses insetos. No eletromiograma da bomba cibarial, o sinal gerado pela contração dos músculos é filtrado, amplificado, digitalizado e armazenado em *software* especialmente desenvolvido para análise (Sant'Anna et al. 2001). Desde então, o eletromiograma tem sido aplicado em diversos modelos biológicos como: barbeiros (Guarneri et al. 2003, Sant'Anna et al. 2001, Araújo et al. 2011, Soares et al. 2014), percevejos de cama (Araújo et al. 2009) e carrapatos (Costa et al. 2016).

Araújo e colaboradores (2009) avaliaram comparativamente os componentes bioativos da saliva e o comportamento alimentar de *C. lectularius* e *C. hemipterus*, alimentados em camundongo, através do registro dos sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial. *C. lectularius* apresentou melhor performance alimentar em relação a *C. hemipterus*. Tal fato pode ser justificado pela maior concentração de proteínas salivares totais na espécie *C. lectularius*, tendo em seu homogenato salivar o dobro da quantidade de hemeproteínas por par de glândula salivar em comparação com *C. hemipterus*. Ainda em *C. lectularius*, o ganho de peso e o tempo total de contato foram maiores nas fêmeas do que nos machos, embora a taxa de ingestão total (razão entre o ganho de peso e tempo total de contato) tenha sido semelhante em ambos os sexos. Em vista disso, as diferenças no desempenho alimentar entre as duas espécies, possivelmente estão relacionadas à maior concentração de proteínas total, bem como, de hemeproteínas presentes na saliva de *C. lectularius*, refletindo na sua maior capacidade de interferir na homeostasia do hospedeiro.

Apesar de Araújo et al. (2009) terem concluído pela melhor eficiência alimentar de *C. lectularius* em relação a *C. hemipterus*, os resultados apresentados naquele trabalho foram baseados apenas no monitoramento dos sinais produzidos pela bomba cibarial, não sendo possível associar com a observação dos eventos que ocorrem no sítio alimentar. Tal limitação poderia ter sido sanada através do uso do eletromiograma da bomba cibarial simultaneamente à microscopia intravital.

2. JUSTIFICATIVA

Os cimiçídeos têm despertado o interesse na saúde humana devido ao seu comportamento hematofágico obrigatório, associado ao alto grau de adaptação ao ambiente humano, sendo considerados uma importante praga urbana. Em consequência, principalmente, da grande dispersão passiva e da dificuldade de controle desses insetos, devido à elevada resistência aos inseticidas disponíveis, observam-se nos últimos anos um aumento das infestações ao nível global, sem sinais de reversão (Boase 2001, Romero et al. 2010, Zorilla-Vaca et al. 2015, Dang et al. 2017). Com isso, grande impacto econômico tem sido atribuído a esses insetos, não só para o controle das infestações, mas também pelos problemas de saúde observados nos hospedeiros ectoparasitados (Reinhardt & Siva-Jothy 2007, Goddard & deShazo 2009, Curl et al. 2011, Delaunay et al. 2011, Zorilla-Vaca et al. 2015, Dong et al. 2017).

Apesar de não serem vetores comprovados de patógenos em condições naturais, os percevejos de cama são importantes ectoparasitos temporários de humanos, já que suas picadas causam grande incômodo. O forte prurido e as reações cutâneas, prejudicam o sono noturno, especialmente em altas infestações, podendo comprometer a vida cotidiana dos indivíduos. Além disso, as lesões na pele podem servir como porta de entrada para infecções secundárias por diferentes patógenos (Honig 1986, Goddard & deShazo 2009, Delaunay et al. 2011, Lai et al. 2016).

Sabe-se que as dermatites, acompanhadas dos diferentes quadros de reações alérgicas, observados nos indivíduos ectoparasitados, ocorrem em resposta às biomoléculas presentes na saliva destes insetos. Em contrapartida, com relação ao cimiçídeo, tais moléculas salivares são fundamentais por contrapor o mecanismo hemostático do hospedeiro vertebrado, facilitando a realização do repasto sanguíneo (Valenzuela et al. 1995, Valenzuela et al. 1996A, Valenzuela et al. 1996A, Valenzuela & Ribeiro 1998, Francischetti et al. 2010). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o processo de salivação de *C. lectularius* durante a hematofagia no hospedeiro mamífero. A correlação entre os momentos de movimentação de peças bucais ou sucção do sangue, com os períodos de liberação de saliva, contribuíram para a descrição mais detalhada do processo hematofágico, destacando-se a importância da salivação neste processo. Dessa forma, foi possível não só determinar os parâmetros e fases do repasto sanguíneo, como também visualizar, em tempo real, toda a alimentação. Tais informações permitirão uma melhor compreensão da interação cimiçídeo-hospedeiro mamífero, bem como, da biologia de *C. lectularius*, abrindo novas perspectivas para estudos na área.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o padrão de salivação de *Cimex lectularius* durante as fases da alimentação na pele do hospedeiro vertebrado.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o processo alimentar de *Cimex lectularius* e as alterações na microcirculação da pele da orelha de camundongos *hairless*, através de análise da microscopia intravital e do eletromiograma da bomba cibarial;
- Marcar o conteúdo das glândulas salivares de *Cimex lectularius* com fluorocromo Laranja de Acridina;
- Descrever o padrão de salivação de *Cimex lectularius* durante o processo alimentar na orelha de camundongos *hairless*, por microscopia intravital, associada ou não ao eletromiograma da bomba cibarial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Insetos utilizados

Os cimicídeos foram coletados, em 2016, em abrigos públicos da Prefeitura de Belo Horizonte - Unidade de Acolhimento Institucional para moradores de rua (“Albergue Tia Branca”); e Unidade de Acolhimento Institucional para migrantes (“Pousadinha Mineira”) - sendo mantidos em condições de insetário desde a ocasião. Os espécimes foram identificados como pertencentes à espécie *C. lectularius* de acordo com Usinger (1966).

Foram utilizadas fêmeas de *C. lectularius* mantidas no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, em condições semicontroladas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12 horas claro/escuro). Os cimicídeos foram mantidos em potes cilíndricos de acrílico, contendo torre de cartolina, dobrada em sanfona, para abrigo dos insetos. A alimentação dos insetos foi realizada semanalmente em camundongos *Mus musculus*/Linhagem *hairless* (HRS/J) previamente anestesiados com Ketamina 150 mg/Kg e Xilazina 10 mg/Kg (1:4).

4.1.2. Hospedeiro mamífero

Foram utilizados, nos experimentos, camundongos *Mus musculus*/Linhagem *hairless* (HRS/J) (30 a 40 dias de vida, ~ 20 gramas) criados no biotério do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, mantidos em gaiolas com a água e ração *ad libitum*. Destaca-se que os camundongos utilizados nos experimentos não tiveram contato prévio com cimicídeos.

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^2 , com espessura aproximada de $300 \mu\text{m}$. À microscopia do corte transversal da orelha, observam-se duas lâminas de pele separadas por um fino suporte de esqueleto cartilaginoso elástico, apresentando todos os componentes encontrados na derme e epiderme humanas, à exceção da gordura subcutânea. Verificam-se também folículos pilosos normais, porém vazios, mais numerosos na fase dorsal e rodeados por glândulas sebáceas. 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 se direcionam à periferia da orelha (Soares et al. 2006).

4.2. Marcação do conteúdo das glândulas salivares de *Cimex lectularius*

Para marcação do conteúdo das glândulas salivares de *C. lectularius* foi utilizado o fluorocromo Laranja de Acridina (LA) (Sigma) na concentração de 0,05%, preparado em salina 0,9% (adaptado de Soares et al. 2006). Para tal, os insetos (fêmeas 7 dias em jejum) foram alimentados com sangue heparinizado humano (5mL) contendo LA (200µL) por uma hora. Foi utilizado um alimentador artificial de vidro, conectado a um termocirculador para manter a temperatura do sangue entre 37 a 39°C, tendo como membrana o pedaço de uma luva de látex previamente lavada (Fig. 8). Foram selecionadas, então, apenas as fêmeas que ficaram completamente ingurgitadas para posterior utilização nos experimentos. Para a confirmação da marcação do conteúdo salivar, parte dos cimicídeos foram dissecados 24 horas após a alimentação e as glândulas salivares examinadas em microscópio de epifluorescência equipado com filtros (excitação: 450-490 nm; emissão: 535 nm). Os experimentos de salivação foram realizados 10 dias após a alimentação com o fluorocromo.

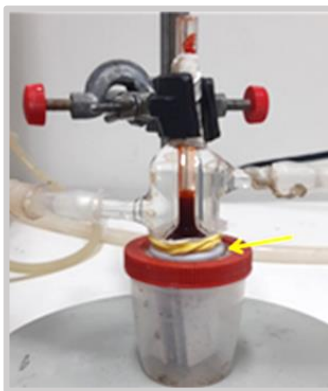


Figura 8. Sistema de alimentação artificial das fêmeas de *Cimex lectularius*, destacando-se a membrana utilizada na mamadeira de vidro (seta amarela).

4.3. Caracterização do padrão de salivação e do processo alimentar de *Cimex lectularius* em camundongos *hairless* por microscopia intravital

A caracterização do perfil de salivação, bem como do processo alimentar de *C. lectularius*, foram realizados utilizando fêmeas (10 dias de jejum), com conteúdo das glândulas salivares principais marcado com LA (conforme item 4.2).

Os camundongos foram anestesiados, via intraperitoneal, com uma combinação de Ketamina 150 mg/Kg e Xilazina 10 mg/Kg (1:4). Durante os experimentos, os animais foram mantidos à $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sobre uma superfície aquecida (Fine Science Tools Inc., Canadá), sendo a temperatura monitorada com auxílio de um sensor retal (Fine Science Tools). Os camundongos tiveram a superfície dorsal da orelha cuidadosamente esticada e fixada sobre um suporte de acrílico com fita adesiva dupla face (Soares et al. 2006). Os experimentos foram iniciados 30 minutos após o manuseio da orelha, com vistas a permitir a estabilização da temperatura e da microcirculação da região.

As fêmeas com o conteúdo das glândulas salivares marcado foram imobilizadas pelo abdome, com auxílio de uma fita de esparadrapo apoiada a uma massa de modelar, deixando o primeiro par de patas livre e, então, alimentadas na orelha dos camundongos (Fig. 9). Dessa forma, foi possível observar a deposição de saliva fluorescente na pele do hospedeiro. Além disso, foram avaliados, visualmente, os seguintes parâmetros relacionados ao processo alimentar dos cimiúdeos: o tipo de vaso utilizado; ocorrência de alterações no diâmetro dos vasos (vasoconstrição e/ou vasodilatação); a presença ou não de hemorragias; ganho de peso (peso final - peso inicial; mg); e tempo total de alimentação, sondagem e ingurgitamento (min). O tempo de sondagem foi determinado como o período de tempo iniciado a partir da introdução das peças bucais no tecido do hospedeiro, com movimentos oscilatórios das mesmas, até o momento de canulação do vaso sanguíneo. Já o tempo de ingurgitamento foi definido como o intervalo de tempo iniciado logo após a inserção do fascículo no vaso sanguíneo, observando-se a pulsação desse, até que o cimiúdeo retirasse espontaneamente suas peças bucais da pele do camundongo. Por fim, o tempo total de alimentação foi definido como a soma dos tempos de sondagem e de ingurgitamento.

Ressalta-se que, para a realização dos experimentos, adotaram-se os cuidados necessários com vistas a reduzir o estresse provocado nos cimiúdeos pela luz, odores fortes, barulho, vibrações e próprio manuseio.

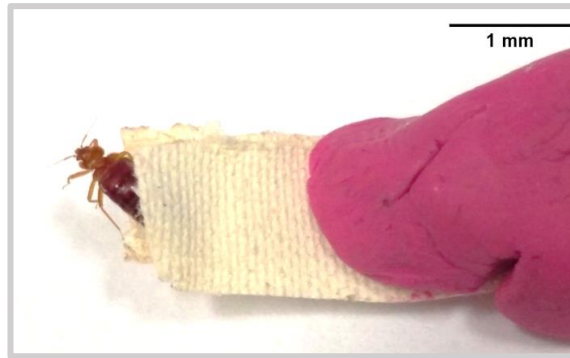


Figura 9: Fêmea de *Cimex lectularius* imobilizada com auxílio de uma tira de esparadrapo fixada em massa de modelar.

4.4. Análise das imagens obtidas nos experimentos de microscopia intravital

Todos os experimentos de microscopia intravital foram filmados com auxílio de uma câmera (Canon EOS 600D) acoplada ao microscópio de epifluorescência (Leica DM 500), equipado com filtros (excitação: 450-490 nm; emissão: 535 nm), ocular de 10X e objetiva de 10X. As imagens produzidas (29,97 quadros por segundo) foram analisadas através do *software* Fiji Image J versão 1.52i. Foi selecionada uma área fixa - denominada de máscara - abrangendo o sítio de alimentação (área de sondagem e/ou vaso canulado) nos vídeos analisados (Fig. 10, seta). É importante mencionar que, o tamanho da área das máscaras foi diferente em cada experimento e que, nos ensaios de salivação, as imagens foram transformadas em escala de cinza (8 bits). A liberação de saliva fluorescente ou a movimentação da parede dos vasos da área selecionada foi estimada utilizando-se a variação da densidade integrada (*Integrated Density – IntDen*). O valor densidade integrada corresponde ao produto da área selecionada e a média da intensidade de cor na escala de cinza (Fig. 10) (Paim et al. 2017). Os valores da IntDen foram transferidos para Microsoft Office Excel 2016 para análise e confecção dos gráficos.

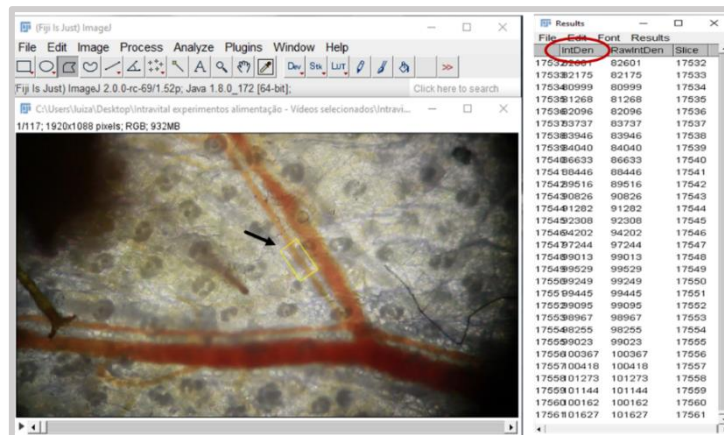


Figura 10: Análise de imagens pelo programa Fiji Image J, a partir dos vídeos obtidos nos experimentos com microscopia intravital. Imagem da microcirculação da pele da orelha (à esquerda) mostrando a área selecionada para análise (seta preta). Os resultados (à direita) indicam a variação de pixels da área delimitada ao longo do tempo. Os valores da densidade integrada (círculo vermelho) foram utilizados para plotagem dos gráficos.

4.5. Eletromiograma da bomba cibarial

A caracterização do comportamento alimentar dos cimiécidos foi também avaliada através dos ensaios de eletromiograma da bomba cibarial (Araújo et al. 2009). Nestes ensaios, os sinais elétricos produzidos pela atividade dos insetos, foram registrados concomitantemente com a visualização do sítio de alimentação durante todo o repasto sanguíneo.

Para tal, um eletrodo de cobre foi fixado junto ao dorso do camundongo anestesiado, e um segundo eletrodo (fio de cobre ou ouro) foi preso à porção ventral do abdome do inseto imobilizado, conforme descrito no item 4.3. A extremidade de ambos os eletrodos foi recoberta com uma fina camada de gel condutor (Mercur S.A.), de forma a facilitar a detecção dos sinais elétricos produzidos pelos músculos da bomba cibarial durante o repasto sanguíneo do cimiécido no camundongo. Os sinais elétricos gerados no processo alimentar foram filtrados, amplificados 210 vezes, e digitalizados por uma placa de aquisição (ADC100®-Pico Technology Limited) conectada a um computador (Fig. 11). Foram rejeitadas as frequências acima de 17 Hz com inclinação de -45dB/octave com vistas a minimizar os ruídos elétricos externos (Sant'Anna et al. 2001).

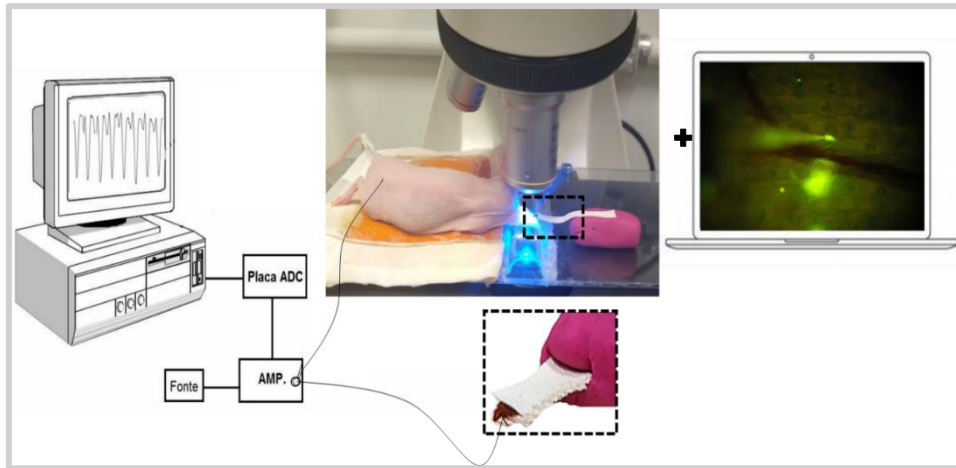


Figura 11: Representação esquemática da técnica de microscopia intravital simultânea ao monitoramento elétrico da bomba cibarial durante alimentação dos cimiúdeos na pele da orelha do camundongo *hairless* anestesiado.

Através da associação da técnica de microscopia intravital simultânea ao monitoramento elétrico da bomba cibarial (Soares et al. 2014), foi possível visualizar a salvação do cimiúdeo, bem como, determinar os diferentes períodos do processo alimentar de cada inseto avaliado (Pereira et al. 2006). Foram considerados: o momento da picada, a fase de sondagem, a fase de ingurgitamento, e a retirada das peças bucais do inseto da pele do hospedeiro. A alimentação das fêmeas foi registrada até que retirassem espontaneamente suas peças bucais da pele do camundongo. O período de sondagem foi estabelecido como sendo o tempo gasto a partir da inserção das peças bucais do inseto na pele do hospedeiro até o início da fase de ingurgitamento. A fase de ingurgitamento foi determinada como o período de tempo iniciado após pelo menos 10 sinais consecutivos típicos atribuídos às contrações da bomba cibarial (Guarneri et al. 2000, Araújo et al. 2009).

4.6. Análise dos dados obtidos nos experimentos de eletromiograma da bomba cibarial

Os registros dos sinais elétricos produzidos pelos cimiúdeos, gerados pelo programa Data Acquisition System, foram analisados no *software* MATLAB versão 7.10, através do programa “Barbeiro.m”, escrito pelo Professor Alberto de Figueiredo Gontijo (COLTEC/UFMG) (Sant’Anna et al. 2001). Este programa analisa os dados dos sinais elétricos gerando representações gráficas: Janela 1 - eletromiograma, que representa os sinais elétricos (mV) produzidos ao longo da alimentação do inseto (Figura 14A); Janela 2 - espectro de frequência, permite a visualização das frequências fundamentais e suas frequências harmônicas

que aparecem no eletromiograma (Figura 14C) e; Janela 3 - espectrograma, mostrando as frequências ao longo do tempo (Figura 14D). Os registros elétricos obtidos por meio do eletromiograma foram transferidos para o Microsoft Office Excel 2016 para a construção dos gráficos e análise.

4.7. Aspectos éticos

Todos os experimentos utilizando camundongos, bem como a manutenção da colônia dos insetos, foram realizados em concordância com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG n.82/2018).

4.8. Análise estatística

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

5.1. Caracterização do processo alimentar de *Cimex lectularius* e alterações na microcirculação da pele da orelha de camundongos *hairless*

A metodologia de imobilização das fêmeas de *C. lectularius* utilizada no presente trabalho (item 4.3) possibilitou observar detalhadamente todas as fases de alimentação, através da técnica de microscopia intravital na pele da orelha de camundongo (Fig. 12). Foram analisados apenas os experimentos nos quais se observou a alimentação completa do inseto ($n = 97$), ou seja, as fases de sondagem e ingurgitamento, seguidas da remoção espontânea das peças bucais da pele do camundongo, tendo sido utilizado um espécime por ensaio.

Em 56,7% (55/97) dos experimentos, os insetos (7-10 dias em jejum) iniciaram a alimentação em até um minuto após serem posicionados diretamente sobre a orelha do camundongo. A fase de sondagem das fêmeas, caracterizada pela movimentação do fascículo na derme do hospedeiro em várias direções, durou em média $0,69 \pm 0,81$ minuto ($n = 76$). É válido mencionar que, durante a sondagem, foi observada a canulação de mais de um vaso até o início, de fato, do ingurgitamento. Já o tempo médio da fase de ingurgitamento foi de $6,44 \pm 3,53$ minutos ($n = 86$). Logo após a introdução das peças bucais nos vasos sanguíneos, verificou-se uma vasoconstrição transitória seguida da pulsação da parede dos mesmos, que perdurou durante todo o ingurgitamento, devido a atividade da bomba cibarial. Embora em alguns ensaios (3/97) os insetos tenham mudado de sítio alimentar, utilizando dois vasos para concluir o ingurgitamento, em 96,9% (94/97) dos experimentos as fêmeas permaneceram a maior parte da alimentação, completando o repasto sanguíneo, em um único vaso. Considerando todos os vasos sanguíneos utilizados pelos cimicídeos durante os experimentos analisados ($n = 100$), não se observou diferença significativa entre o número de arteríolas ($58/97 = 59,7\%$) e de vênulas canuladas ($42/97 = 43,2\%$) (qui-quadrado, N.S.). O tempo total médio de alimentação dos insetos foi de $6,81 \pm 3,44$ minutos ($n = 78$). Já o ganho de peso médio das fêmeas alimentadas na microcirculação da pele da orelha dos camundongos *hairless* foi de $5,0 \pm 2,2$ mg ($n = 62$).

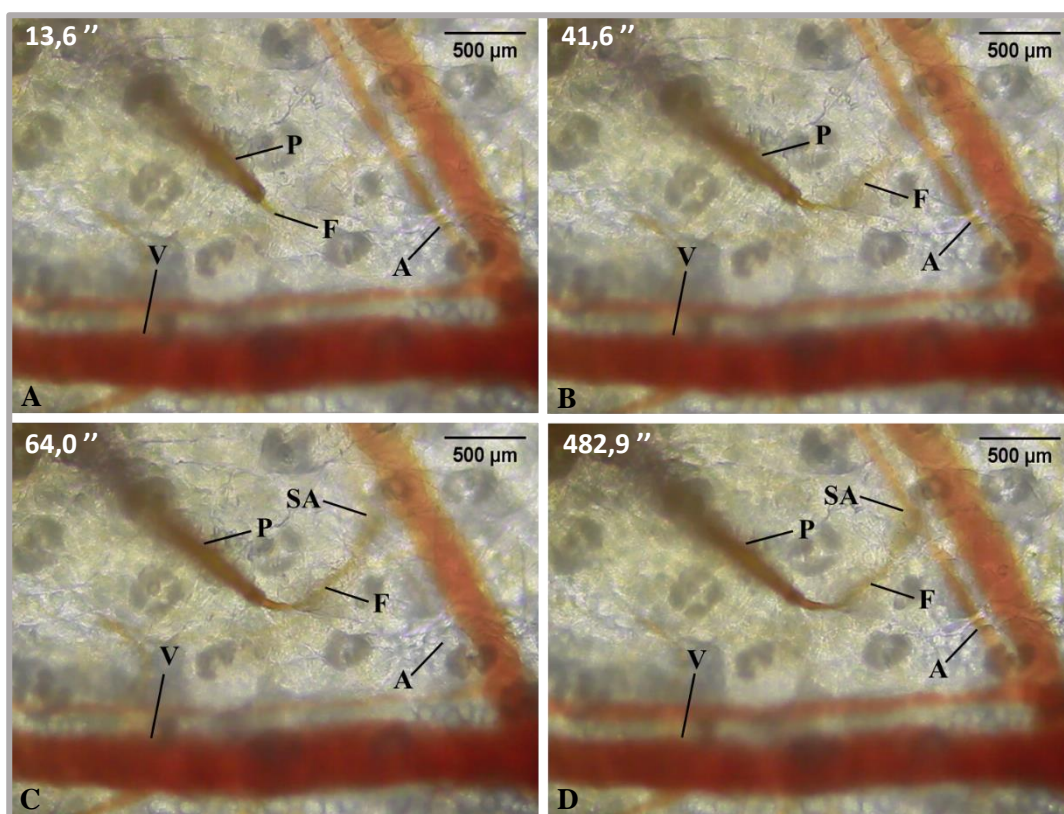


Figura 12: Fases da alimentação de fêmeas de *Cimex lectularius* na microcirculação da pele da orelha do camundongo *hairless* observadas através de microscopia intravital: (A) logo após a picada (13,6 seg.); (B) início da fase de sondagem (41,6 seg.), apresentando movimentos oscilatórios do fascículo em várias direções no tecido; (C) início da fase de ingurgitamento (64,0 seg.), pouco depois da inserção das peças bucais na luz da arteríola, demonstrando uma contração transitória da mesma; (D) momento da fase de ingurgitamento (482,9 seg.), no qual se observa o fascículo no sítio alimentar. Legenda: P, probóscide; F, fascículo; SA, sítio de alimentação; A, arteríola; V, vênula. Considerou-se o momento da picada igual ao tempo 0.

Durante a alimentação dos cimicídeos, a movimentação das peças bucais e o funcionamento da bomba cibarial, juntamente com a deposição de saliva (detalhado item 5.3), interferem diretamente na microcirculação da pele do hospedeiro. Dessa forma, durante os experimentos, constatou-se uma vasoconstrição transitória logo após a introdução das peças bucais nos vasos sanguíneos. Essa contração dos vasos foi observada tanto nas arteríolas 86,2% (50/58) quanto nas vênulas 69% (29/42) (qui-quadrado, N.S.). Entretanto, ao final dos experimentos, depois da retirada das peças bucais do vaso, foi verificada vasodilatação em 84,4% das arteríolas (49/58) e em 54,7% das vênulas (23/42) (Tab. 1).

Tabela 1: Alterações nos vasos sanguíneos da microcirculação da pele da orelha de camundongos *hairless* desencadeadas pelo processo alimentar de fêmeas de *Cimex lectularius*, avaliadas por microscopia intravital, no início do ingurgitamento e logo após a retirada das peças bucais da pele do camundongo.

Alterações no vaso	Vênulas canuladas (n=42)	Arteriolas canuladas (n= 58)
Constricção	68% (n = 29)	86,2% (n = 50)
Dilatação	54,7% (n = 23)	84,4% (n = 49)
Sem alteração	59,5% (n = 25)	20,6% (n = 12)

Outra alteração observada na microcirculação da pele do hospedeiro ao longo do processo alimentar de *C. lectularius*, foi a presença de hemorragias, sobretudo ao final do repasto sanguíneo. Ainda que não tenha sido o achado mais comum, este fenômeno foi observado em 37% dos ensaios realizados (36/97) (Fig. 13). Embora o número de hemorragias tenha sido maior em arteriolas (80,5%) quando comparado às vênulas (19,4%), essa diferença não foi estatisticamente significativa (qui-quadrado, N.S.). Ressalta-se que todas as hemorragias foram verificadas logo após a retirada das peças bucais do vaso canulado (Fig. 13).

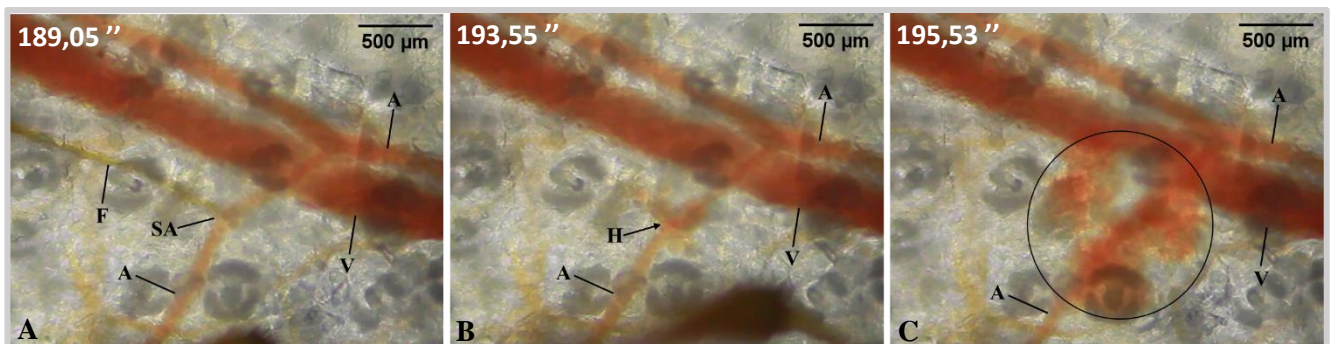


Figura 13: Hemorragia observada logo após a retirada das peças bucais de *Cimex lectularius* da arteriola da pele da orelha de camundongos *hairless*, observada através da técnica de microscopia intravital: (A) final da fase de ingurgitamento (189,05 seg.); (B) logo após a retirada das peças bucais do vaso canulado (193,55 seg.); (C) região adjacente ao sítio de alimentação com extravasamento de sangue (círculo preto) (195,53 seg.). Legenda: H, hemorragia; F, fascículo; SA, sítio alimentar; A, arteriola; V, vênula. Tempo 0 = momento da picada.

Neste trabalho, utilizou-se o eletromiograma para obtenção de dados complementares àqueles gerados pela microscopia intravital, favorecendo, assim, a compreensão do processo alimentar (Fig. 14). Pelo espectro de frequência dos eletromiogramas da fase de ingurgitamento dos cimicídeos, baseado na análise de 37 experimento, verificou-se que a frequência de contração média da bomba cibarial foi de $4,1 \pm 1,3$ Hz.

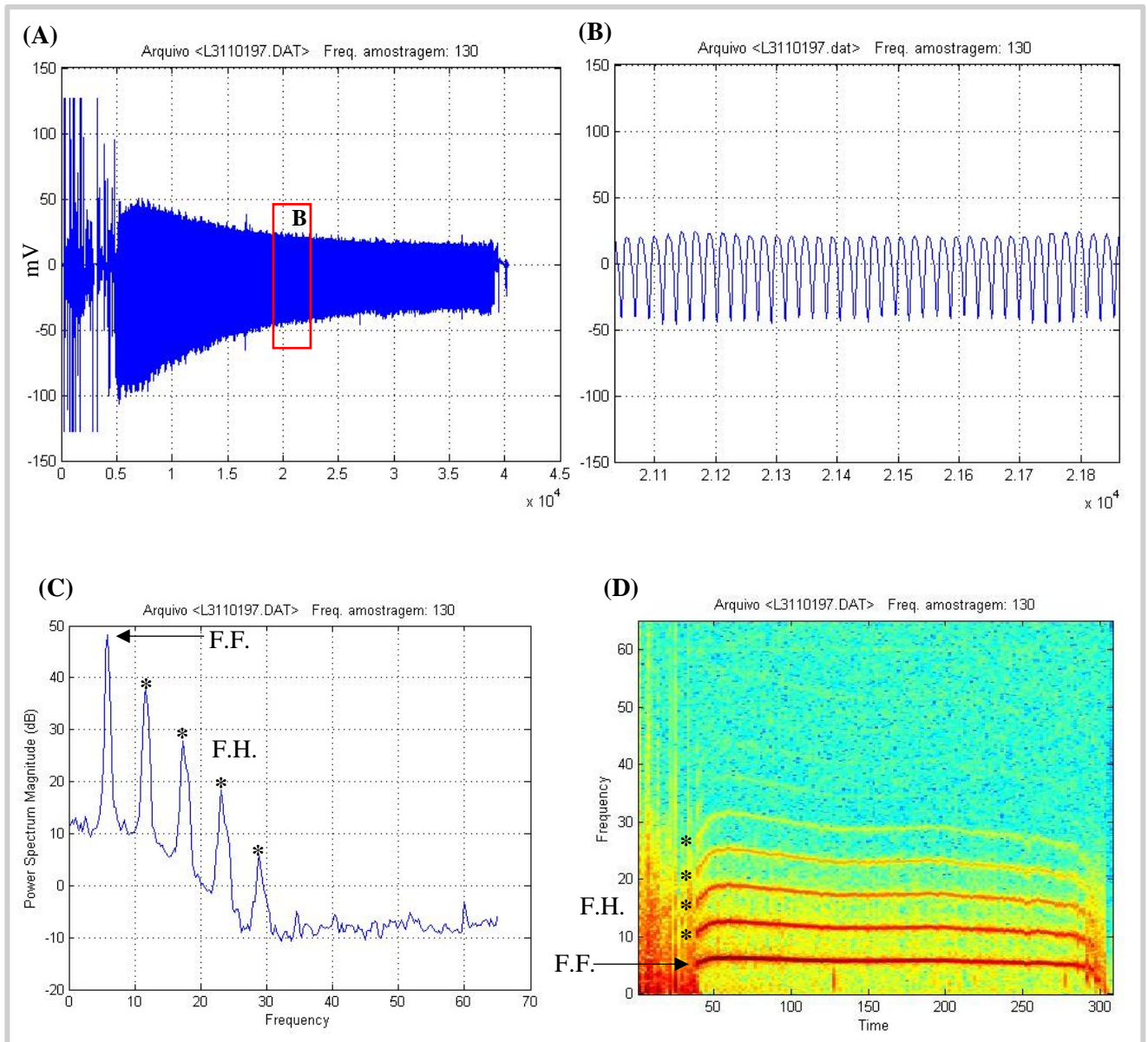
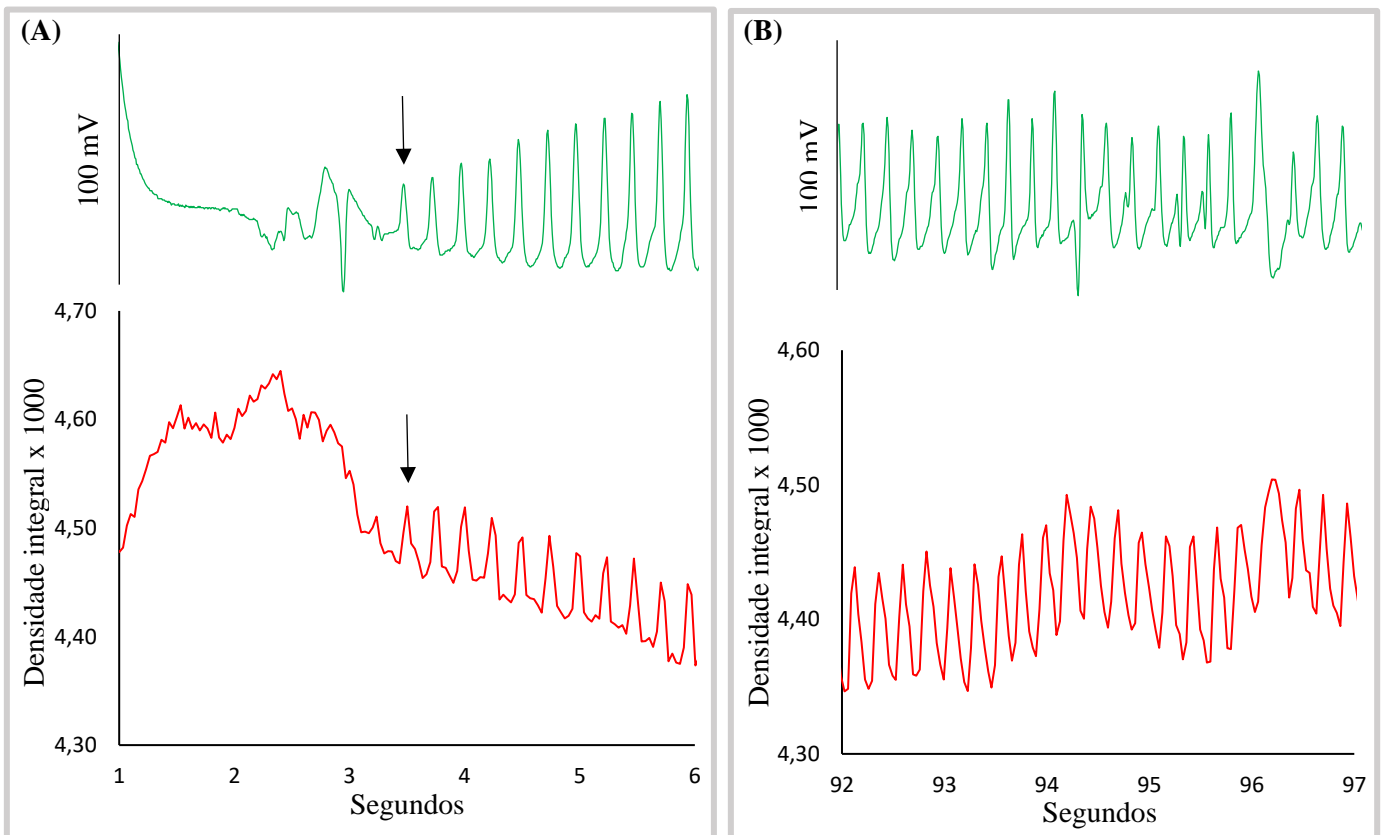


Figura 14: Análise do eletromiograma da bomba cibarial de uma fêmea de *Cimex lectularius*, alimentada em uma vênula da pele da orelha de camundongo, utilizando o programa “Barbeiro.m” no software MATLAB: (A) sinais elétricos (mV) produzidos ao longo da alimentação do inseto; (B) detalhe da área selecionada em A (caixa vermelha), evidenciando os sinais elétricos (picos) gerados pela atividade da bomba cibarial na fase de ingurgitamento; (C) espectro de frequência da contração da bomba cibarial, mostrando a frequência fundamental e suas frequências harmônicas (asteriscos); (D) espectrograma com a frequência fundamental e

suas frequências harmônicas ao longo do tempo. Legenda: F.F., frequência fundamental; F.H., frequências harmônicas.

A análise concomitante do eletromiograma e da microscopia intravital, durante o ingurgitamento dos cimiúdeos, revelou a correspondência entre os picos dos sinais elétricos e o movimento de vibração da parede do vaso sanguíneo, já que ambos os eventos estão relacionados com o funcionamento da bomba cibarial (Fig. 15). Uma vez que a contração dos músculos associados à bomba cibarial, provoca a expansão desta região do tubo digestivo, faz com que o sangue passe da luz do vaso para o interior inseto. Essa correspondência confirma a hipótese de que os sinais elétricos produzidos durante a fase de ingurgitamento, como observado por Araújo e colaboradores (2009), se devem, principalmente, à contração dos músculos associados à parede da bomba cibarial, ou seja, é um eletromiograma.

É importante mencionar que, considerou-se como início da fase de ingurgitamento o momento no qual foram detectados, pelo eletromiograma picos regulares característicos da atividade da bomba cibarial, associados a visualização, pela microscopia intravital, do início da vibração da parede do vaso sanguíneo, após a inserção das peças bucais (Fig. 15A).



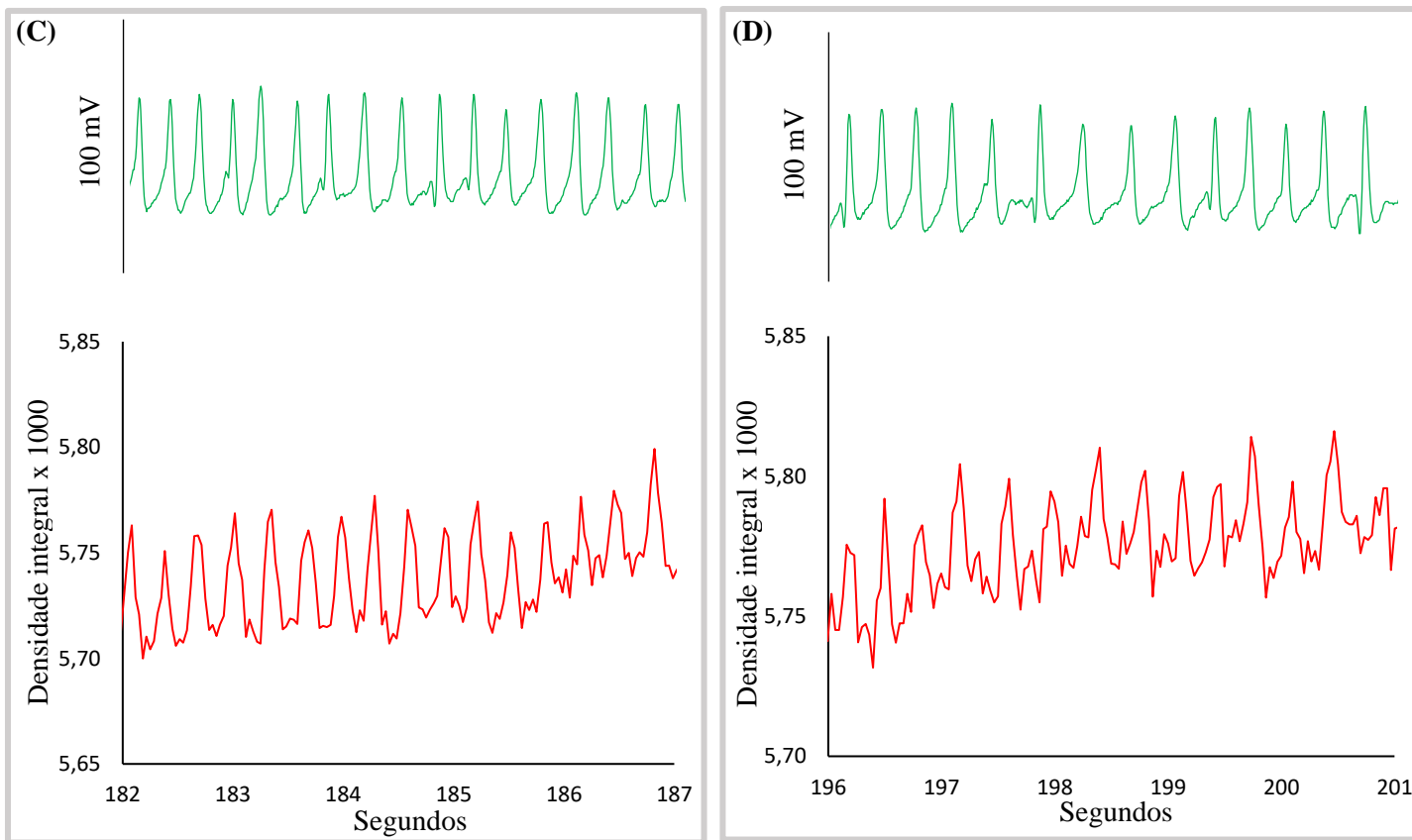


Figura 15: Sinais elétricos produzidos pelas contrações da bomba cibarial (linhas verdes) e representação gráfica da vibração da parede do vaso sanguíneo (linhas vermelhas), durante a ingestão de sangue por uma fêmea de *Cimex lectularius*, na pele da orelha de camundongo: (A) início da fase de ingurgitamento (seta), onde já é possível observar a correspondência entre os sinais elétricos (picos) e o movimento de retração da parede do vaso; (B) final da primeira metade do repasto sanguíneo, quando, geralmente, observam-se frequências de bombeamento mais altas e maiores amplitudes do movimento da parede dos vasos; (C) representação de um momento da segunda metade do repasto sanguíneo, quando se observa a redução da frequência e picos irregulares; (D) momento próximo ao final da alimentação, quando observam-se baixas frequências e picos irregulares com baixa amplitude.

5.2. Marcação do conteúdo das glândulas salivares de *Cimex lectularius* com fluorocromo Laranja de Acridina

As fêmeas que realizaram o repasto completo com sangue acrescido de Laranja de Acridina 0,05%, apresentaram o conteúdo das glândulas salivares principais fluorescente 24 horas após a alimentação (Fig. 16). Embora os cimicídeos apresentem naturalmente uma autofluorescência (Reinhardt et al. 2016), observou-se que após a alimentação com o corante, além das glândulas principais, os olhos e o tubo digestivo (principalmente o intestino) exibiram um aumento na intensidade da fluorescência, indicando a presença do fluorocromo nessas partes do inseto (Fig. 17). Ressalta-se que apenas as glândulas principais acumularam o corante, não sendo visualizada a marcação nas glândulas acessórias. As fêmeas permaneceram com os órgãos marcados por, aproximadamente, um mês depois de alimentadas com o fluorocromo, período no qual mantiveram suas funções vitais aparentemente inalteradas, incluindo a capacidade de oviposição. Além disso, a administração do corante não causou mortalidade dos insetos durante o período de observação.

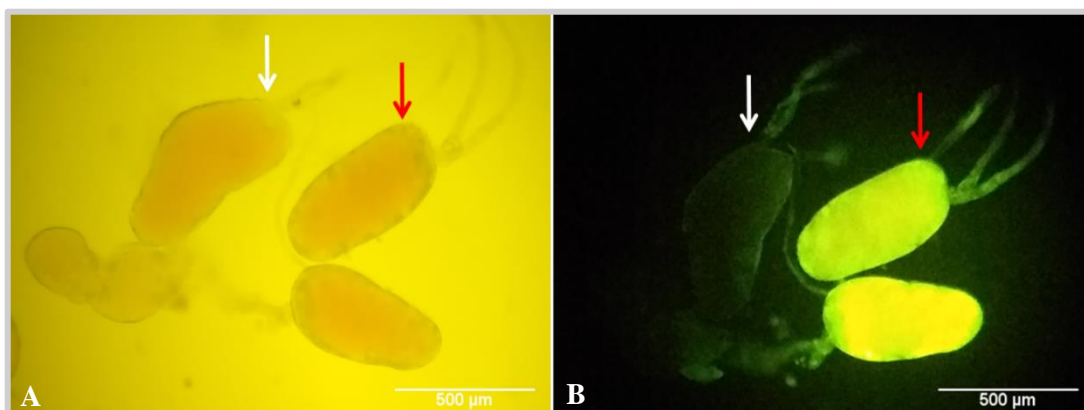


Figura 16: Par de glândulas salivares principais de *Cimex lectularius* observadas sob microscópio de epifluorescência. Glândulas extraídas 24 horas após a alimentação apenas com sangue heparinizado humano (inseto controle, indicado pelas setas brancas) ou com sangue heparinizado humano acrescido de Laranja de Acridina 0,05% (inseto marcado, indicado por setas vermelhas): (A) luz visível; (B) luz azul (excitação: 450-490 nm; emissão: 535 nm).

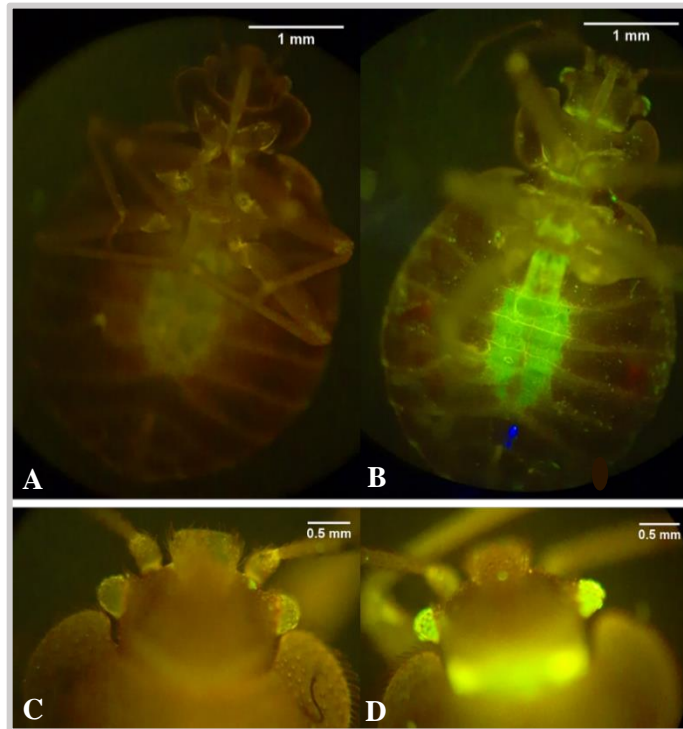


Figura 17: Fêmeas de *Cimex lectularius* observadas sob microscópio de epifluorescência (excitação: 450-490 nm; emissão: 535 nm) 24 horas após alimentação apenas com sangue heparinizado humano (inseto controle) ou com sangue heparinizado humano acrescido de Laranja de Acridina 0,05% (inseto marcado) com destaque para o tubo digestivo (vista ventral; A. inseto controle e B. inseto marcado) e olhos (vista dorsal; C. inseto controle e D. inseto marcado).

5.3. Descrição do padrão de salivação de *Cimex lectularius* durante o processo alimentar na orelha de camundongos *hairless*

Na caracterização do processo de salivação de *C. lectularius*, foram analisados somente os experimentos nos quais se verificou a alimentação completa dos insetos marcados (n = 48), tendo sido utilizado um espécime por ensaio.

No momento em que o cimicídeo era posicionado sobre a orelha do camundongo, mesmo antes da picada, era possível observar que a ponta da probóscide e o fascículo apresentavam-se fluorescentes, pela prévia marcação do inseto. Em seguida, a saliva começava a ser depositada no tecido, no mesmo instante do contato das peças bucais do inseto com a pele do camundongo (Fig. 18A). Dessa forma, enquanto o fascículo realizava os movimentos de sondagem, observou-se um forte rastro fluorescente, que aumentava até o início da fase de ingurgitamento. Constatou-se, portanto, que na fase de sondagem, a liberação de saliva ocorre continuamente e em grande

quantidade (Fig. 18B). Essa intensa liberação de saliva durante a sondagem foi bastante comum, ocorrendo em 91,6% (44/48) dos ensaios de alimentação realizados com os insetos marcados, sendo que em quatro experimentos praticamente não houve fase de sondagem. Em vários experimentos, as fêmeas sondavam diferentes locais da pele da orelha do camundongo, antes da canulação do vaso, deixando áreas fluorescentes que permaneciam por algum tempo no tecido. Dessa forma, no experimento mostrado na figura 18, observou-se a presença de uma região fluorescente acima do sítio de alimentação, decorrente da saliva liberada durante uma sondagem prévia do inseto (Fig. 18A, B, C).

O início da fase de ingurgitamento, foi evidenciado pela vibração rítmica da parede do vaso sanguíneo canulado, em resposta ao funcionamento da bomba cibarial durante sucção do sangue. Em 56,2% (27/48), também foi possível verificar o começo do ingurgitamento pela visualização da mudança de cor do fascículo, o qual deixa de ser fluorescente e passa a ser vermelho escuro (Fig. 18B e C). Anteriormente à canulação do vaso sanguíneo, a fluorescência era visualizada devido à presença de saliva no canal salivar. Porém, ao iniciar o ingurgitamento, o fascículo mudava sua coloração, apresentando uma tonalidade vermelha escura. Essa visível mudança de cor ocorria em consequência da entrada de sangue pelo canal alimentar, visto que além dos dois canais se encontrarem sobrepostos na probóscide dos cimiécidos, o diâmetro do canal alimentar é maior que o do canal salivar (Dickerson & Lavoipierre 1959).

No decorrer da fase de ingurgitamento, observou-se, em 52% (25/48) dos experimentos, uma nítida redução da fluorescência nas regiões da derme previamente sondadas pelo inseto, permanecendo uma fluorescência somente em uma área próxima ao ponto de inserção das peças bucais no vaso canulado (Fig. 18D - F). Essa redução da fluorescência na pele ao longo do tempo, foi verificada naquelas regiões onde o cimiécido realizou apenas a sondagem (Fig. 18A - D). A diminuição da fluorescência, provavelmente, ocorreu pela drenagem da saliva através da circulação linfática da pele da orelha.

Durante o ingurgitamento, foi possível observar, visualmente, diferentes padrões de fluorescência (salivação): i) fluorescência presente durante todo o ingurgitamento, em 52,0% (25/48), como verificado na figura 18; ou ii) fluorescência que desaparece até o final do ingurgitamento, sendo intermitente em alguns momentos, visto em 47,9% (23/48) ensaios. Nesses dois padrões, independentemente de um ou outro, foi verificado em 58,3% (28/48) um discreto aumento da intensidade de fluorescência, na região do tecido adjacente a parede externa do vaso canulado (Fig. 18E), indicando uma nova liberação de saliva neste período. Entretanto, em 43,7% (20/48) dos experimentos, não foi possível verificar visualmente esse aumento de fluorescência durante a ingestão do sangue, sugerindo que a quantidade de saliva liberada pelo

inseto foi bem pequena, ou mesmo que a salivação não ocorreu em todos os analisados espécimes, nesta fase.

Em 39,5% (19/48) dos ensaios, verificou-se também uma marcação fluorescente próxima a parede do vaso, após a retirada das peças bucais do vaso canulado (Fig. 18F), demonstrando que a saliva foi liberada pelo cimicídeo até o final da alimentação.

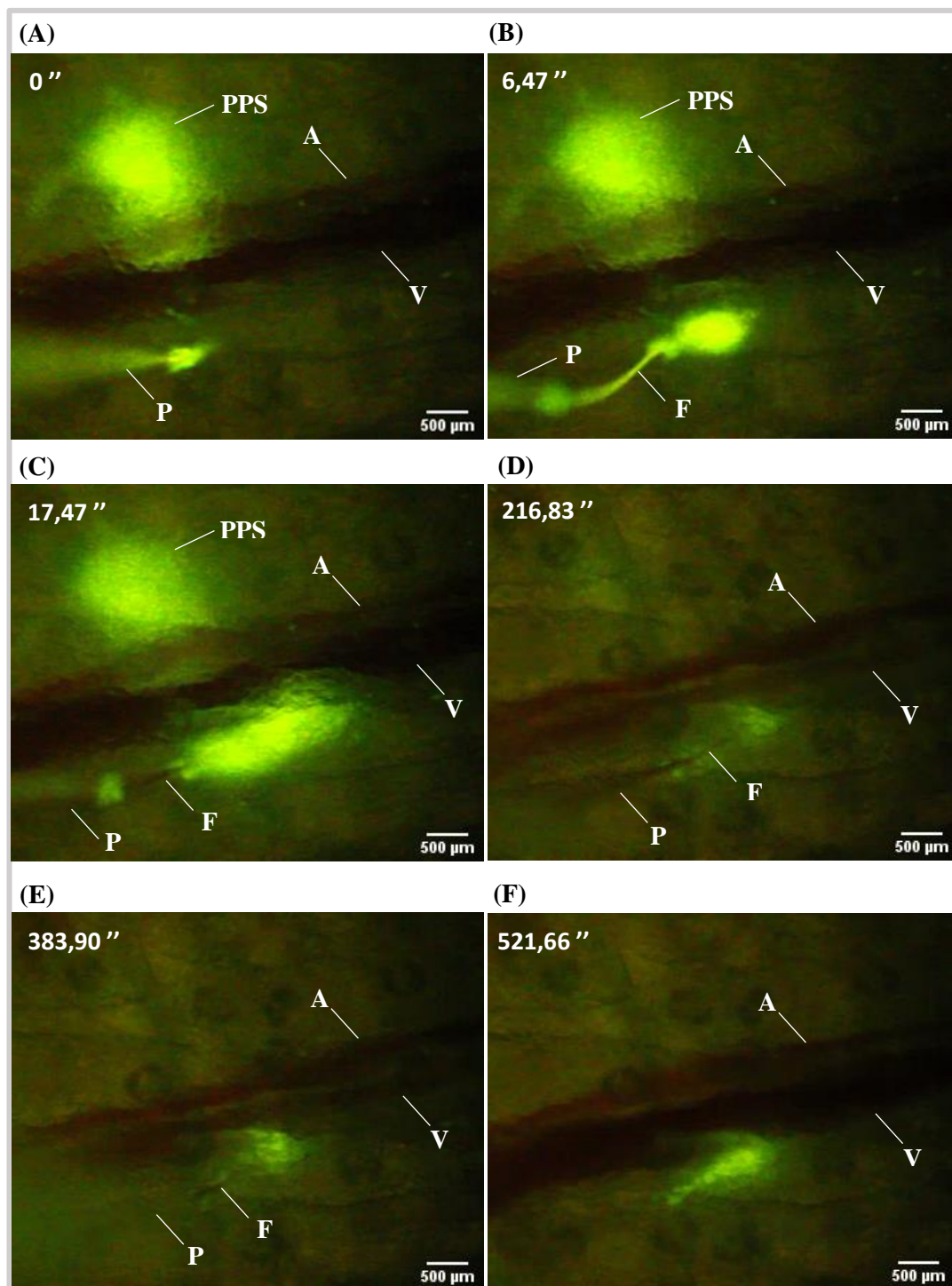


Figura 18: Salivação de *Cimex lectularius* durante o repasto sanguíneo, na pele da orelha do camundongo *hairless*, observada pelo conteúdo salivar marcado com Laranja de Acridina

através da microscopia intravital: (A) momento da picada e início da deposição de saliva da fase de sondagem (0 seg.); (B) intensa liberação de saliva durante a fase de sondagem (6,47 seg.); (C) momento de canulação da vênula e início da fase de ingurgitamento (17,47 seg.); (D) primeira metade da fase de ingurgitamento, exibindo nítida redução da fluorescência nas regiões do tecido sondado pelo inseto (216,83 seg.); (E) segunda metade da fase de ingurgitamento, evidenciando um aumento da intensidade de fluorescência na região próxima a parede do vaso sanguíneo no sítio alimentar (383,90 seg.); (F) final da alimentação, logo após a retirada das peças bucais, mostrado fluorescência próxima a parede externa do vaso canulado (521,66 seg.).
Legenda: P, probóscide; F, fascículo; A, arteíola; V, vênula; PPS, região da pele sondada previamente pelo inseto.

A partir da observação visual, durante a alimentação dos insetos que tiveram a saliva marcada, constatou-se que a salivação se inicia logo após a picada, ocorrendo ao longo de toda a fase de sondagem. No entanto, o perfil de salivação durante a fase de ingurgitamento não teve um padrão, gerando dúvidas como, por exemplo, se a liberação é contínua ou intermitente, bem como o local de deposição (dentro ou fora do vaso).

Assim, visando estimar a distribuição da saliva ao longo do tempo na pele do hospedeiro, monitorou-se a densidade integrada (DI) (aproximadamente a fluorescência) de uma área da pele - dividida em 132 subáreas, que englobava o sítio de alimentação do inseto (sondagens + ingurgitamento) e regiões próximas adjacentes. Para isto, o primeiro passo dessa análise foi delimitar as subáreas da pele onde houve deposição ativa de saliva pelo cimiúdeo, nas diferentes fases de alimentação (Fig. 19A). Uma vez que a fluorescência no ponto de deposição da saliva na pele diminuiu ao longo do tempo, como observado visualmente, para estimar as subáreas onde o inseto salivou durante a hematofagia, incluíram-se os valores da densidade integrada correspondentes aos três períodos distintos de cada fase (1ª metade, 2ª metade e o período total). Dessa forma, foi possível inferir se a fluorescência estava aumentando ou reduzindo em cada subárea da pele durante a fase em questão (Fig. 19B - D).

A utilização concomitante do ranqueamento realizado a partir da mediana da DI de cada subárea na 2ª metade de cada fase da alimentação, com a avaliação se houve diminuição de fluorescência durante os respectivos períodos analisados, como mostrado na figura 19B - D, possibilitou delimitar as subáreas da pele onde ocorreu salivação do inseto (Fig. 19A). Esta análise permitiu separar as áreas da pele analisadas em duas sub-regiões (áreas de salivação e áreas adjacentes), tornando possível avaliar como a saliva liberada pelo inseto se distribuiu no tecido do hospedeiro no decorrer da hematofagia.

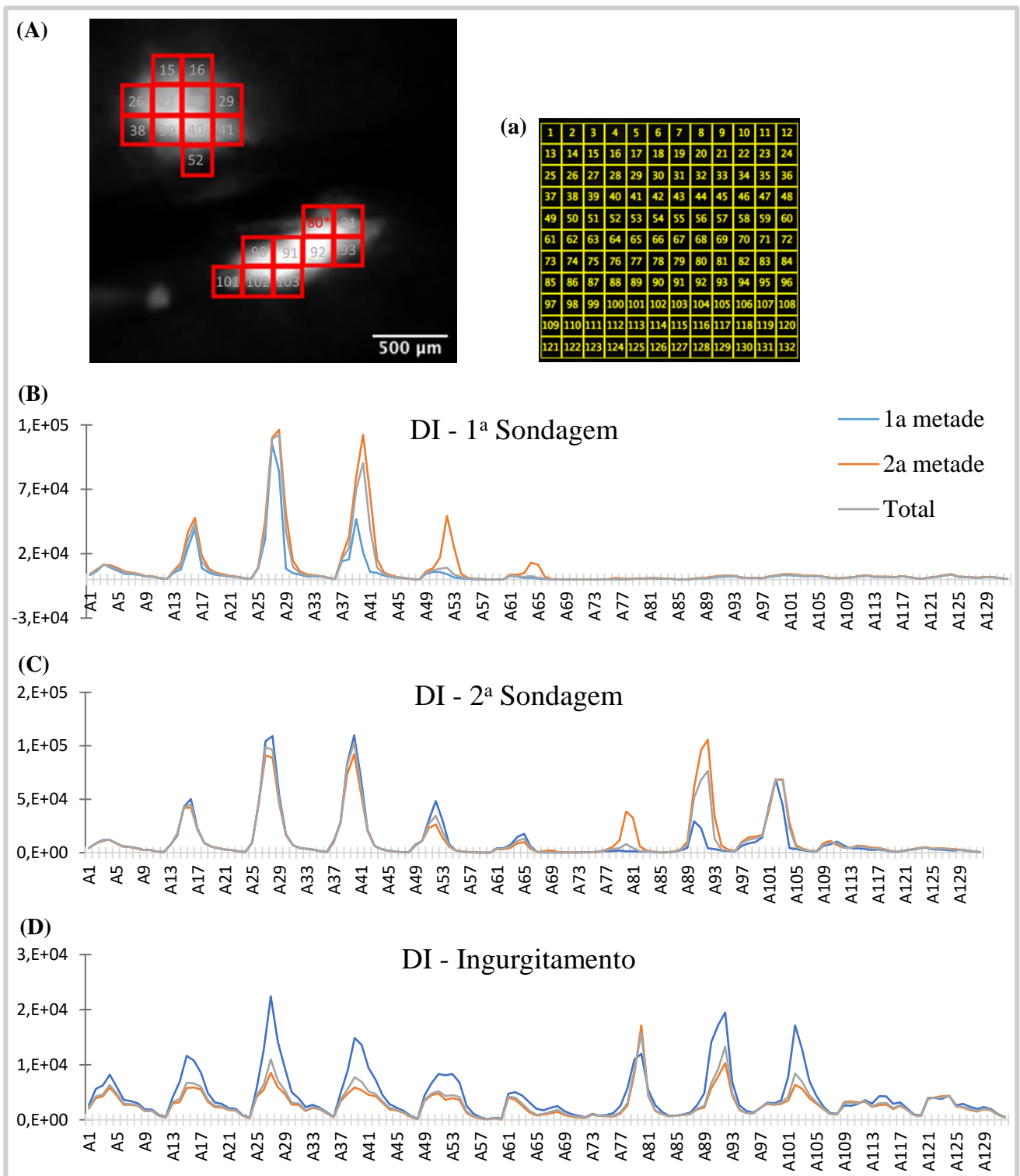


Figura 19: Análise da densidade integrada de uma área ($4,7 \text{ mm}^2$) da pele do hospedeiro, circundante ao sítio de alimentação de *Cimex lectularius* com saliva marcada com o fluorocromo Laranja de Acridina 0,05%. (A - C): mediana da densidade integrada (DI) de cada uma das 132 subáreas ($0,036 \text{ mm}^2$) correspondendo a 1ª metade, 2ª metade e do período do total da fase da 1ª sondagem (A), da 2ª sondagem (B) e do ingurgitamento (C); (D): delimitação das regiões onde ocorreu deposição da saliva sobre a foto do momento da maior fluorescência da pele do

hospedeiro (B = final da 2ª sondagem), mostrando no detalhe (foto menor) a disposição espacial das 132 subáreas utilizadas na análise.

Nesse contexto, a observação dos perfis da somatória da DI referentes as áreas de salivação e das áreas adjacentes (Fig. 20A), mostram, em ambas as áreas, um aumento de fluorescência no decorrer das sondagens, com rápida redução no período inicial do ingurgitamento (até ~ 20%). A partir daí as duas curvas se estabilizam, apresentando valores um pouco acima dos apresentados antes da alimentação. No ponto onde as curvas se cruzam, os valores relativos as áreas adjacentes tornam-se superiores aos das áreas de salivação. Este perfil da fluorescência durante as fases de alimentação dos insetos, apresentando um rápido aumento da DI durante a sondagem, seguido de queda durante o ingurgitamento, foi observado em 25 ensaios.

A semelhança do perfil das áreas de salivação com o das áreas adjacentes nos gráficos de superfície, sugere uma rápida difusão da saliva depositada na pele do hospedeiro. Essa rápida difusão formaria um gradiente radial de saliva a partir do ponto de deposição, fato que explicaria o formato aproximado de cone observado nos gráficos (Fig. 20B - E). Estes, mostram a distribuição da DI pelas diferentes áreas da pele, cujos vértices correspondem as áreas da pele onde a saliva foi depositada pelo inseto (Fig. 20B - E). A difusão da saliva também explicaria a redução da altura do cone e aumento do diâmetro da base, com passar do tempo, após a deposição da saliva, como pode ser observado na modificação do formato do “cone” formado na região da primeira sondagem nos gráficos B, C e D da figura 20.

Ressalta-se que, nas regiões da pele irrigada pelos vasos sanguíneos (arteríola e vênula), como nas áreas entre os dois “cones” da figura 20B e C (constatado pela observação da figura 18B e C), praticamente não apresentou aumento da DI durante a alimentação dos insetos. Tal fato pode ser verificado em áreas equidistantes do vértice dos cones e onde os vasos sanguíneos não passavam. Isto ocorre provavelmente pela pequena quantidade de saliva liberada durante o ingurgitamento, que é rapidamente diluída pelo sangue quando penetra ou é jogada dentro do vaso.

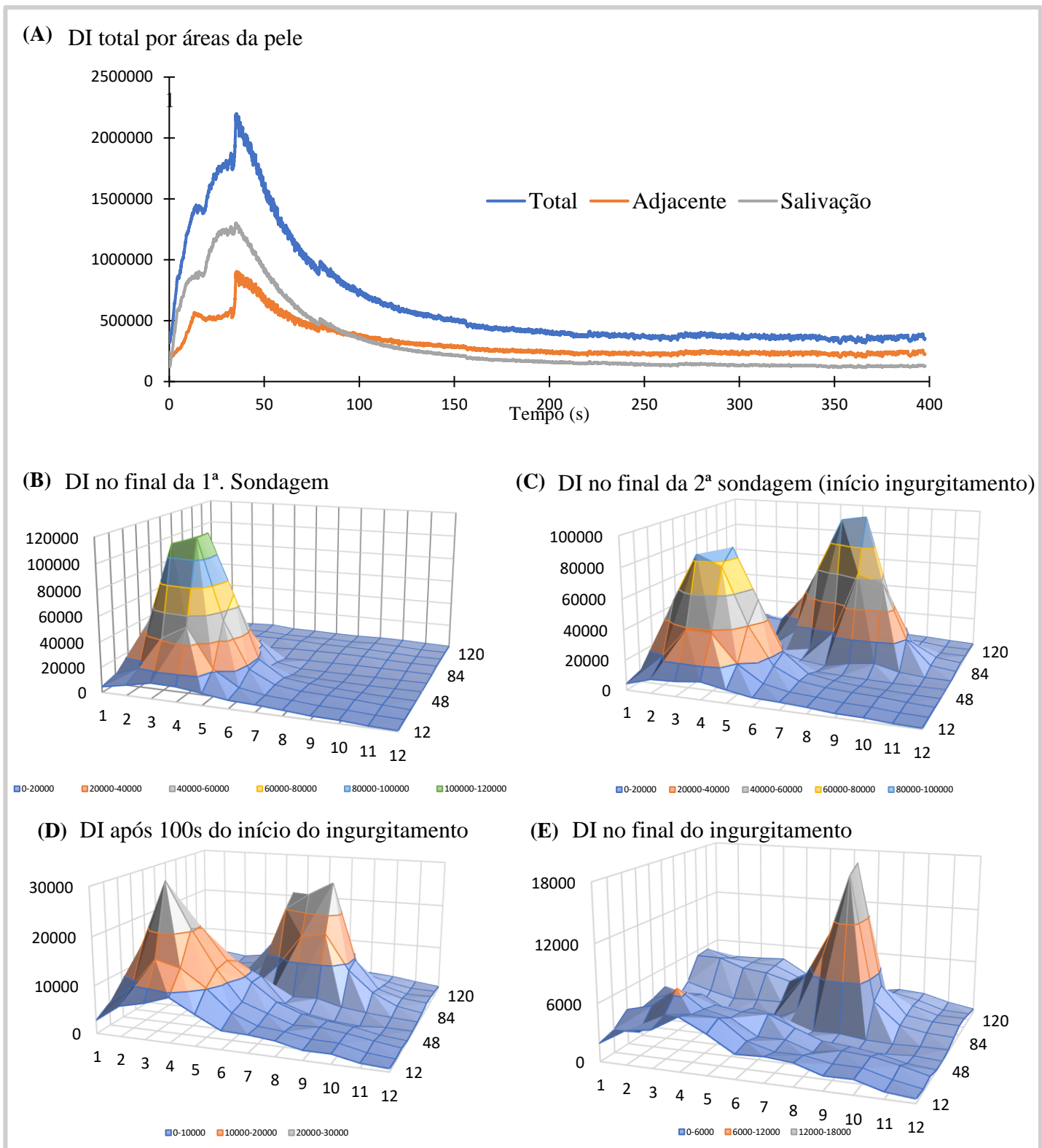


Figura 20: Distribuição da saliva (deposição e difusão) na pele da orelha de camundongo durante a alimentação de *Cimex lectularius*: (A): perfil da somatória da densidade integrada (DI) ao longo da alimentação, referente a área total e as áreas de salivação e adjacentes, e linhas vermelhas destacando alguns tempos de cada fase [1 - picada (0,0 seg.), 2 - final 1ª sondagem (12 seg.), 3 - início 2ª sondagem (32,9 seg.), 4 - início ingurgitamento (39,9 seg.), 5 - final da

alimentação (397,7 seg.); (B - E): gráficos de superfície mostrando os valores da DI das 132 subáreas da pele do hospedeiro, circundante ao sítio de alimentação do inseto no final da 1ª sondagem (B), no final da 2ª sondagem (C), após 100 segundos do início do ingurgitamento (D) e no final do ingurgitamento (E).

Considerando que em 52% (25/48) dos experimentos foi possível observar a liberação de saliva na pele durante a fase de ingurgitamento, e que o canal salivar dos cimicídeos é formado por justaposição das maxilas, torna-se importante verificar se, quando ocorre a liberação de saliva na pele, o inseto interrompe ou não a ingestão de sangue. Os momentos de liberação da saliva na pele, poderiam ser explicados pela retirada temporária das maxilas de dentro do vaso sanguíneo durante a fase de ingurgitamento, gerando interrupções no processo de bombeamento do sangue. Nesse sentido, foram realizados experimentos onde observou-se o processo de alimentar por meio da análise de imagem (microscopia intravital) simultaneamente com o eletromiograma da bomba cibarial. Em 29,0% dos ensaios (9/31) ensaios, foi possível observar que a liberação de saliva na pele não alterou os registros dos eletromiogramas, nem o perfil da vibração da parede dos vasos sanguíneos, dois parâmetros associados ao funcionamento da bomba cibarial (Fig. 21B e C). Ao longo da fase de ingurgitamento, a bomba cibarial apresentou regularidade de funcionamento (Fig. 21C), mesmo nos momentos em que se verificou a deposição de saliva próxima a parede do vaso. É interessante mencionar que, o monitoramento da salivagem durante a fase de ingurgitamento, é afetado pela vibração da parede do vaso sanguíneo, o que reforça que a saliva é liberada na pele próxima a parede do mesmo (Fig. 18D, E).

Desse modo, constatou-se que, durante o ingurgitamento, apesar de também observada a deposição de saliva fora do vaso sanguíneo, isto não acarreta na interrupção do processo de bombeamento do sangue, ou seja, os cimicídeos conseguiram salivar e ingerir o sangue ao mesmo tempo.

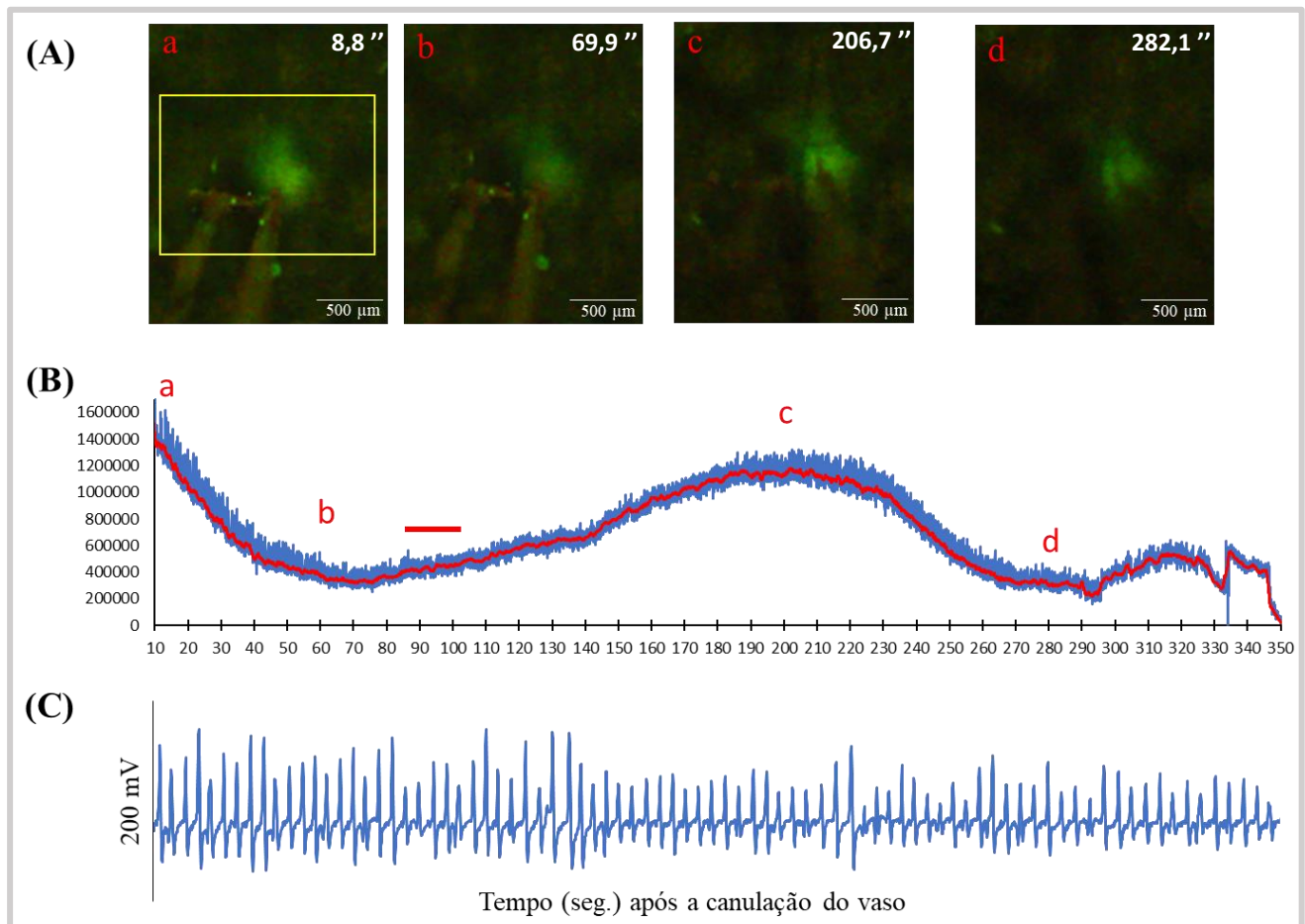


Figura 21: Deposição de saliva na pele da orelha de camundongo, associado aos registros da vibração da parede do vaso canulado e do eletromiograma da bomba cibarial durante a alimentação de *Cimex lectularius*: (A) momentos de deposição de saliva na pele durante a fase de ingurgitamento (a = 8,8 seg.; b = 69,9 seg.; c = 206,7 seg.; d = 282,1 seg.); (B) perfil de salivação monitorado pela fluorescência [valor densidade integral da área selecionada pelo retângulo amarelo ($2,1 \text{ mm}^2$)] durante a fase de ingurgitamento ao longo do tempo - o valor da fluorescência apresentou oscilações, evidenciada pela largura da linha azul em decorrência a vibração da parede do vaso, cada ponto da linha vermelha representa a média da fluorescência dos 30 frames subsequentes (~ 1 segundo de observação); (C) sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial (eletromiograma) em um período de selecionado (barra vermelha), indicando que não houve interrupção da alimentação do inseto durante a deposição de saliva próximo a parede do vaso, evidenciado pelo aumento da fluorescência nesta região da derme.

6. DISCUSSÃO

Para realização do repasto sanguíneo, os cimicídeos introduzem suas peças bucais na pele do hospedeiro, movimentando-as até sua penetração no vaso sanguíneo, desencadeando diferentes reações hemostáticas no sítio de alimentação. A fim de reparar tais reações e, ao mesmo tempo, se alimentar de forma eficiente, estes insetos apresentam, em sua saliva, diferentes biomoléculas indispensáveis à hematofagia. Neste trabalho, de forma pioneira, com o uso da microscopia intravital simultaneamente ao eletromiograma da bomba cibarial, caracterizou-se o processo de salivação de *C. lectularius* durante o repasto sanguíneo na pele do hospedeiro mamífero, possibilitando melhor entendimento de aspectos não só da biologia dos cimicídeos, mas, principalmente, da interação ectoparasito-hospedeiro.

Na caracterização do processo alimentar de *C. lectularius*, observou-se, através da microscopia intravital, que os insetos canularam tanto arteríolas quanto vênulas do hospedeiro mamífero, sem preferência por um ou outro. Sabe-se que a “escolha” do vaso sanguíneo a ser canulado, dentre outros fatores, depende de seu calibre. Dickerson e Lavoipierre (1959) relataram que, quando as peças bucais de *C. lectularius* encontram um capilar muito pequeno ou um vaso grande, esses são ignorados, ou seja, o inseto não os canulam, e o fascículo continua a sondagem no tecido até o encontro de um vaso ideal. Em triatomíneos, o diâmetro do vaso também interfere no repasto sanguíneo (Soares et al. 2014), entretanto, para estes insetos foi identificado preferência por vênulas, com maior calibre, em relação às arteríolas (Soares et al. 2006, Soares et al. 2014). Soares e colaboradores (2014) observaram que durante o processo alimentar na pele da orelha de camundongos, *R. prolixus* canulou com maior frequência vênulas (63%), uma vez que elas, por estarem adjacentes às arteríolas, ocupam maior área. Além disso, as vênulas possuem menor capacidade de contração, contribuindo para maior dilatação destes vasos. Contudo, *R. prolixus* apresentou um maior aproveitamento no repasto sanguíneo quando realizado em arteríolas, possivelmente, devido ao maior fluxo sanguíneo, embora ofereçam maior dificuldade em serem canuladas (Soares et al. 2006). Vale destacar que, em alguns experimentos com *C. lectularius*, devido a alguma dificuldade que prejudicou a passagem do sague para o canal alimentar, como, por exemplo, as reações hemostáticas, os insetos não hesitavam em canular outro vaso e reiniciar a alimentação.

No presente trabalho, o ganho de peso médio obtido pelas fêmeas de *C. lectularius* alimentadas na microcirculação da pele da orelha de camundongos foi de 5,0 mg. Porém, quando alimentadas na região abdominal do camundongo, Araújo e colaboradores (2009), observaram um ganho de peso médio de 9,2 mg, demonstrando que o sítio de alimentação pode

influenciar na obtenção do sangue. Esta diferença, provavelmente, deveu-se a uma maior dificuldade em manter o fluxo sanguíneo na microcirculação da orelha, e não em encontrar o vaso sanguíneo, já que os insetos eram posicionados sobre o mesmo. Além disso, as fêmeas que se alimentaram na região abdominal do camundongo, eram mantidas soltas dentro de um recipiente, ou seja, com livre circulação no tecido (Araújo et al. 2009), diferentemente daquelas alimentadas na pele da orelha do camundongo, as quais foram imobilizadas pelo abdome com uma fita de esparadrapo. Esta imobilização pode ter causado uma leve compressão no abdome do inseto, o que diminuiu a capacidade de expansão abdominal e, conseqüentemente, provocou uma redução no ganho de peso. Embora os insetos fossem imobilizados durante a alimentação, eles foram capazes de completar o repasto sanguíneo, demonstrando que a metodologia adotada nesse estudo não interferiu no processo alimentar. Durante o repasto sanguíneo, a probóscide do cimidídeo ficava posicionada verticalmente a pele, ficando encoberta pela cabeça do inseto, o que dificultava a visualização das peças bucais. Dessa maneira, a fixação das fêmeas pelo abdome e o seu posicionamento na orelha do camundongo, foi imprescindível para observação de todo o processo alimentar.

A fim de conseguir realizar o repasto sanguíneo de forma eficiente, os cimidídeos utilizam de diferentes mecanismos - ação mecânica das peças bucais, funcionamento da bomba cibarial, deposição de saliva no sítio alimentar, dentre outros que, isolados ou associados, interferem na microcirculação da pele hospedeiro mamífero. Nesse sentido, dois eventos foram observados durante o processo alimentar das fêmeas de *C. lectularius* na orelha do camundongo *hailess*, local no qual a disponibilidade de arteríolas e vênulas é bastante limitada, a saber: vasoconstrição transitória no início do ingurgitamento, seguida de vasodilatação ao final da alimentação, ambos mais comuns nas arteríolas. Tais eventos também foram observados em *R. prolixus*, alimentados na microcirculação da pele da orelha de camundongos, mas, com diferenças em relação ao vaso sanguíneo. Enquanto nas vênulas o achado mais comum foi a dilatação, nas arteríolas foi mais comum a constrição, ambos após a remoção das peças bucais do vaso canulado (Soares et al. 2014).

Referindo-se à vasoconstrição transitória, no momento em que os espécimes de *C. lectularius* inseriam o fascículo no lúmen do vaso sanguíneo, observou-se uma forte contração do vaso, que desaparecia, quase que por completo, seguida de movimentação pulsante que perdurava por todo o período do repasto, principalmente nas arteríolas. Funcionalmente, tal observação se traduziu na interrupção momentânea da passagem do sangue, seguida da retomada da circulação sanguínea, sendo a pulsação observada como reflexo do funcionamento contínuo da bomba cibarial e, conseqüente sucção do sangue. Após a remoção do aparelho bucal

pelos cimiúdeos, observou-se que o vaso, anteriormente canulado, se encontrava mais dilatado, confirmando a participação dos componentes antihemostáticos da saliva durante a hematofagia dos percevejos de cama. O contato com as diferentes biomoléculas salivares faz com que o vaso sanguíneo canulado altere seu diâmetro, uma vez que a saliva também é liberada próxima a sua parede. Dessa forma, destaca-se a participação da nitroforina, proteína encontrada em grande quantidade na saliva de *C. lectularius* - aproximadamente 40% do conteúdo total das proteínas solúveis (Valenzuela et al. 1998), responsável por liberar o NO, promovendo vasodilatação e inibindo a agregação plaquetária no sítio de alimentação (Ribeiro & Nussenzveig 1993). O efeito vasodilatador está relacionado ao fato do NO regular o tônus vascular, resultando no relaxamento da musculatura lisa da parede do vaso (Andersen et al. 2003). Já a inibição da agregação de plaquetas se deve à ativação da enzima guanilato-ciclase-citosólica pelo NO (Ribeiro et al. 1995, Soares et al. 2014). A ligação NO-NP ocorre reversivelmente dependendo da concentração de pH do meio. O NO se liga fortemente à NP em pH ácido, como a condição encontrada nas glândulas salivares dos cimiúdeos (neste trabalho verificado pela marcação com LA), sendo liberado em pH neutro ou básico, como ocorre no tecido do hospedeiro (Ribeiro et al. 1993, Valenzuela et al. 1995, Soares et al. 2006). É interessante ressaltar, também, que a NP de *C. lectularius* se liga reversivelmente a duas moléculas de NO, a fim de promover a estabilização do gás por longos períodos, já que é liberado tanto de forma rápida, quanto de forma mais lenta (Walker 2005, De Simone et al. 2017).

Apesar de não ter sido uma observação frequente no presente trabalho, foram identificadas hemorragias sendo, na maioria dos casos, visualizadas em arteríolas, embora esta diferença não seja significativa quando comparadas às vênulas. Este fenômeno pode ser explicado considerando que as arteríolas possuem menor diâmetro em relação as vênulas e maior fluxo sanguíneo, facilitando, assim, o extravasamento do sangue. Ressalta-se que as hemorragias foram visualizadas logo após a retirada do fascículo do interior do vaso sanguíneo, ao final da alimentação de *C. lectularius*, quando finalizado o ingurgitamento. Tal observação pode estar relacionada ao fato de que os cimiúdeos apresentam mandíbulas com pontas dentadas voltadas para trás, que ficam encostadas na parede do vaso canulado, fixando firmemente o aparato bucal no tecido do hospedeiro. Dessa forma, no momento de retirada do fascículo da pele do hospedeiro, o cimiúdeo pode encontrar alguma dificuldade, forçando a parede do vaso e, com isso, o dilacera produzindo a hemorragia (Dickerson & Lavoipierre 1959). Contudo, esses resultados contrariam os observados por Dickerson e Lavoipierre (1959), os quais descreveram a presença de pequenas hemorragias durante a fase de sondagem de *C. lectularius* alimentados na orelha de camundongos, fenômeno considerado comum, ocasionado pelo

movimento das peças bucais do inseto na busca de um vaso adequado. A ocorrência de micro hemorragias, durante a sondagem ou na remoção das peças bucais dos vasos, também foi observada por Lavoipierre e colaboradores (1959) em *R. prolixus*. Tal achado corrobora com os relatados por Soares et al. (2006) em *R. prolixus* alimentados na pele da orelha de camundongos, em que foram frequentes hemorragias durante o processo alimentar destes insetos, principalmente na fase de sondagem. Esses mesmos autores, entretanto, demonstraram, mais tarde, que hemorragias mais extensas ocorrem principalmente nas arteríolas após a retirada das peças bucais, ao fim do repasto de *R. prolixus* (Soares et al. 2006), corroborando os resultados obtidos nesse presente estudo.

Na caracterização do processo alimentar dos cimicídeos, utilizando o eletromiograma da bomba cibarial, Araújo e colaboradores (2009) determinaram os eventos que antecedem e sucedem a alimentação dos percevejos de cama. A contração dos músculos associados à parede externa da bomba provoca a expansão desta região, fazendo com que o sangue passe do canal salivar para o tubo digestivo, através da pressão negativa gerada pela mesma (Bennet-Clark 1963). Assim, a partir dos sinais produzidos por esta contração, é possível avaliar as diferentes fases do processo alimentar, corroborando os resultados aqui encontrados, de que os sinais elétricos produzidos durante a fase de ingurgitamento se devem, principalmente, à contração dos músculos associados a bomba cibarial. A técnica de monitoramento elétrico da bomba cibarial foi utilizada primeiramente em triatomíneos por Guarneri e colaboradores (2000), sendo aperfeiçoada e posteriormente empregada em cimicídeos (Araújo et al. 2009). Neste trabalho, os autores avaliaram comparativamente a performance alimentar de *C. lectularius* e *C. hemipterus* em camundongos. *C. lectularius* apresentou uma melhor eficiência alimentar em relação a *C. hemipterus*, sendo o ganho de peso maior nas fêmeas que nos machos (fêmeas ingerem duas vezes mais sangue que os machos), justificando a escolha de fêmeas para os ensaios no presente trabalho.

Para a descrição do processo de salivagem de *C. lectularius* durante o repasto sanguíneo, na orelha de camundongos *hairless*, inicialmente fez-se necessário corar o conteúdo salivar dos cimicídeos, tendo sido utilizado o fluorocromo Laranja de Acridina. Semelhantemente ao observado em *R. prolixus* (Soares et al. 2006), a marcação de tal material biológico se fez possível pela diferença de pH existente entre a hemolinfa e glândula salivar principal dos insetos, já que a LA possui afinidade por ambientes ácidos. Nesse sentido, quando presentes na hemolinfa (pH próximo ao neutro), a maioria das moléculas de LA estão desprotonadas, atravessando a membrana celular, podendo atingir, por difusão, todas as regiões do corpo do inseto, que fica todo corado. Entretanto, quando chegam em um ambiente ácido, como no

interior das glândulas salivares de *C. lectularius* e *R. prolixus*, as moléculas de LA são protonadas, adquirindo carga positiva. Isso impede que elas atravessem a membrana, acumulando-se nesse local (Zoccarato et al. 1999). Caso as glândulas salivares e a hemolinfa tivessem pH semelhante, próximo ao 7, o corante seria rapidamente eliminado pelos túbulos de Malpighi, não se observando acúmulo do fluorocromo, como ocorre em *T. infestans*. Nesta espécie, o exoesqueleto se mostrou fluorescente 24 horas após a ingestão da solução contendo LA, porém não houve acúmulo de corante nas glândulas salivares, já que possuem pH entre 6,5-7,0 (Soares et al. 2006). Assim como *T. infestans*, as glândulas acessórias de *C. lectularius* também não apresentaram acúmulo de LA, possivelmente devido ao pH alcalino do seu conteúdo salivar. Este achado foi igualmente verificado para espécie *C. hemipterus*, a qual possui o conteúdo salivar das glândulas acessórias pH neutro (Castrillon 2007). Ainda nesse sentido, apesar dos insetos apresentarem autofluorescência (Reinhardt et al. 2016), verificou-se nas fêmeas de *C. lectularius* alimentadas com LA, maior intensidade de fluorescência nos olhos e no tubo digestivo, provavelmente pelo ambiente ácido desses órgãos. Além disso, observou-se a excreção do fluorocromo pelos cimicídeos, através de gotas alaranjadas presentes nas torres de papel filtro nas quais os insetos eram mantidos. Ressalta-se que a presença de LA no sangue heparinizado humano aparentemente não causou nenhum dano fisiológico ou mortalidade nas fêmeas de *C. lectularius*, visto que, após a alimentação, as mesmas sobreviveram por mais de 30 dias em jejum, realizando posturas regulares. Isso demonstra a não toxicidade desse composto, na concentração utilizada, para estes cimicídeos. Em *R. prolixus*, a ingestão de grande quantidade de solução contendo LA, resultou em mortalidade significativa dos insetos nas primeiras 48 horas pós alimentação, estando ainda com ingurgitados, possivelmente pela dificuldade na excreção do excesso de líquidos (Soares et al. 2006).

A partir da marcação do conteúdo das glândulas salivares principais com LA, a análise do processo alimentar de *C. lectularius*, na pele da orelha de camundongo *hairless*, revelou que a salivação ocorre durante todo o repasto sanguíneo - entendendo-se aqui a fase de sondagem e de ingurgitamento - mesmo enquanto o inseto realizava a sucção do sangue. Tal fato se deve à existência de um canal alimentar independente do canal salivar, em decorrência da justaposição das maxilas (Puri et al. 1924, Dickerson & Lavoipierre 1959). Isso, não só facilita o mecanismo de salivação por estes insetos, como também, possibilita a ingestão de sangue e a ejeção de saliva de maneira simultânea. Além disso, a presença de uma musculatura independente da bomba salivar e da bomba cibarial (Puri et al. 1924, Usinger 1966), permite o funcionamento contínuo de ambas, ocorrendo liberação de saliva mesmo durante o ingurgitamento.

Apesar da salivação de *C. lectularius* ocorrer durante todo o repasto sanguíneo, ela se mostrou distinta nas fases de sondagem e de ingurgitamento. Na fase de sondagem, os cimidéos movimentam seu fascículo na derme do hospedeiro em várias direções, até o encontro de um vaso sanguíneo adequado (Dickerson & Lavoipierre 1959). Enquanto realizava esses movimentos, observou-se, através da microscopia intravital, o lançamento contínuo de grande quantidade de saliva na derme do hospedeiro, principalmente em regiões próximas aos vasos sanguíneos. Esse processo é fundamental para a canulação do vaso, na perspectiva de que, alguns componentes salivares promoverão a dilatação da microcirculação, facilitando, assim, a alimentação do inseto. Ainda, durante a sondagem, verificou-se a formação de um rastro contínuo fluorescente na derme do camundongo, visto que a saliva marcada não era prontamente drenada pelo tecido. Com o passar do tempo, lentamente, a fluorescência foi perdendo intensidade, provavelmente devido a drenagem da saliva pela circulação linfática da derme. Este mesmo perfil de salivação de *C. lectularius*, na fase sondagem, foi observado em *R. prolixus*. Neste inseto, foi visto que, ao mesmo tempo que as maxilas realizam movimentos oscilatórios no tecido do camundongo, na busca por um vaso sanguíneo, ocorre um bombeamento contínuo de saliva através do canal salivar até a derme, formando também um rastro, que se difunde posteriormente (Soares et al. 2006). Uma vez que a saliva desses triatomíneos também possui uma grande variedade de moléculas antihemostáticas (Ribeiro 1987), a salivação na sondagem propicia uma rápida e eficiente alimentação. Ribeiro e Garcia (1981) observaram que *R. prolixus* salivarectomizados, em comparação com insetos controle, apresentavam maior dificuldade no encontro dos vasos sanguíneos e picavam o hospedeiro um maior número de vezes, confirmando a importância da saliva nesta etapa da alimentação.

Referindo-se à fase de ingurgitamento de *C. lectularius* na pele da orelha do camundongo *hairless*, observou-se que a deposição de saliva se concentrou no local de inserção das peças bucais ao redor do vaso sanguíneo canulado. Em raros momentos, foi observada a passagem de saliva no interior do vaso canulado, mas, a maior parte dela era, de fato, vista apenas próximo ao vaso. Isso pode ser explicado pelo modo como as peças bucais se posicionam durante o ingurgitamento. Nos cimidéos, mandíbulas e maxilas penetram profundamente na derme para até o encontro do vaso sanguíneo, porém, acredita-se que, somente a maxila direita é inserida no seu lúmen (Dickerson & Lavoipierre 1959). A observação de cortes histológicos das peças bucais no momento da alimentação em um vaso, mostrou que a maxila direita fica com sua extremidade mais à frente da esquerda, formando uma boca funcional (Fig. 5) (Dickerson & Lavoipierre 1959). Dessa forma, infere-se que a maioria da saliva é lançada do canal salivar para próximo à parede do vaso, e não dentro dele, como visto pela microscopia. As demais

estruturas do fascículo, mandíbulas e a maxila esquerda, provavelmente ficam apenas encostadas na parede do vaso, fixando o aparato bucal ao mesmo (Dickerson & Lavoipierre 1959). Nesse sentido, os picos produzidos pelo processo de salivação são correspondentes aos gerados pelo movimento pulsante do vaso canulado, indicando, que a saliva é jogada perto da parede externa do vaso. Esta constante pulsação do vaso sanguíneo no ingurgitamento, ocorre em resposta a pressão negativa gerada pelo funcionamento da bomba cibarial na sucção do sangue (Soares et al. 2014). Além disso, observou-se que o volume e a intensidade da saliva liberada na fase ingurgitamento, foi inferior ao observado na etapa de sondagem. Destaca-se que, em alguns momentos pontuais, foi observado um aumento na intensidade de fluorescência, demonstrando nova ejeção de saliva pelo cimícideo durante o ingurgitamento. Ademais, não foi possível constatar uma periodicidade nas emissões de saliva pelos cimicídeos. O fato da salivação também ocorrer próximo à parede externa do vaso sanguíneo, dificultou a captação da frequência de liberação da saliva, uma vez que a pulsação do vaso também é registrada pela análise. A contaminação da área no entorno do sítio alimentar, pela saliva fluorescente ejetada durante a sondagem, somado ao pequeno volume liberado, impossibilitam a determinação da frequência de salivação.

Finalmente, não foi observado a ingestão de saliva por *C. lectularius*, durante o repasto sanguíneo, corroborando a nossa ideia inicial de que a emissão da maior parte da saliva ocorre fora do lúmen do vaso, próximo ao sítio de alimentação. Diferentemente da salivação observada em *C. lectularius* na fase de ingurgitamento, Soares e colaboradores (2006) observaram em *R. prolixus*, grande quantidade de saliva liberada em *bolus* no interior do vaso canulado, sendo a maior parte dela ingerida pelo inseto juntamente com o sangue. Esse perfil pode ser atribuído ao modo como as peças bucais se dispõem na retirada do sangue. Nos triatomíneos, o par de mandíbulas serrilhadas apenas perfura e ancora o aparato bucal na região superficial da pele do hospedeiro. Já as maxilas (direita e esquerda), que também formam por aposição os canais alimentar e salivar, penetram até a derme e ambas são introduzidas na luz do vaso para a retirada do sangue (Lavoipierre 1959). Ainda nesse sentido, o fato de *R. prolixus* salivar em *bolus*, no lúmen do vaso sanguíneo, possibilitou estimar a frequência de emissão de saliva ao longo da etapa de ingurgitamento, apesar de não serem constantes (Soares et al. 2006).

O fato dos cimicídeos salivarem bem próximo do sítio alimentar, atrelado à pequena quantidade de saliva liberada durante o ingurgitamento, indica que a sucção do sangue ocorre no mesmo local em que o aparelho bucal foi inserido na luz do vaso. Isso se entenderia na ausência de movimentos com a maxila no interior do vaso, a fim de favorecer a sucção de sangue. Assim, quando os cimicídeos encontram dificuldade para retirar o sangue (a exemplo

da diminuição do fluxo sanguíneo ou a resposta hemostática do hospedeiro) os mesmos realizam nova salivagem no local. Em *R. prolixus* entretanto, Soares et al. (2014) verificaram que no decorrer do ingurgitamento, os insetos comumente realizam pequenos movimentos com as maxilas no interior dos vasos, com o objetivo de direcionar a ponta das peças bucais e facilitar a ingestão do sangue. Tais autores descreveram a ocorrência de uma lenta migração das maxilas pelo lúmen do vaso, que mudam a posição da abertura do canal alimentar (a favor ou contra a corrente sanguínea) em relação à ponta da probóscide.

O lançamento da saliva pelos cimiécidos, também fora do vaso canulado, diretamente no tecido do hospedeiro, favorece o contato dos componentes salivares antihemostáticos com a parede externa vaso sanguíneo, facilitando a alimentação dos insetos, bem como promovendo a ocorrência de reações cutâneas. Tais moléculas podem gerar, na pele do hospedeiro, além de forte prurido, reações alérgicas de intensidade variável (Goddard & deShazo 2009, Dogget et al. 2012). Dentre os agentes antigênicos presentes na saliva de *C. lectularius* ressalta-se a nitroforina (Valenzuela et al. 1995), principal proteína responsável por tais reações cutâneas (Leverkus et al. 2006). Assim como nos cimiécidos, a saliva dos triatomíneos apresenta uma grande diversidade de biomoléculas. Porém, as picadas dos barbeiros não provocam reações alérgicas tão intensas, como observado em resposta às picadas dos percevejos de cama. Uma possível explicação para isso é o fato de que a salivagem ocorre dentro do vaso sanguíneo, bem como, ocorre a ingestão de quase toda a saliva pelos triatomíneos. Utilizando *R. prolixus* como modelo, observou-se que, quando o inseto está na fase de ingurgitamento, se alimentando normalmente, quase toda a saliva liberada é ingerida junto ao sangue pelo inseto. Por outro lado, quando diminui o fluxo de sangue ao redor das maxilas e/ou é reduzida a frequência de contração da bomba cibarial, menos saliva é ingerida e, conseqüentemente, sua concentração aumenta dentro do vaso, potencializando a ação dos componentes salivares. Este mecanismo de modulação da quantidade de saliva depositada na microcirculação minimiza o contato da saliva com a pele do hospedeiro diminuindo, assim, a possibilidade de desenvolvimento de resposta aos antígenos salivares (Soares et al. 2006).

Nesse trabalho, a utilização da microscopia intravital atrelada ao eletromiograma da bomba cibarial permitiu não só identificar as diferentes fases da alimentação, através do funcionamento da bomba cibarial, como também relacionar com os momentos de salivagem. A microscopia intravital permite a visualização dos eventos que estão acontecendo no sítio alimentar, fornecendo informações não obtidas no eletromiograma, sendo extremamente útil para relacionar os eventos do processo alimentar aos eventos de salivagem (Costa et al. 2016). Através dessas metodologias, observou-se que a alimentação dos insetos não é interrompida

enquanto ocorre a liberação de saliva. Verificou-se um discreto aumento na intensidade de fluorescência, devido ao lançamento de saliva durante o ingurgitamento, ao mesmo tempo que ocorria a atividade regular da bomba cibarial e, a conseqüente, sucção do sangue. Contudo, em alguns casos, não foi observada a fluorescência durante o funcionamento da bomba cibarial, confirmando a reduzida quantidade de saliva liberada, ou mesmo, sugerindo que a salivação não ocorre em todos os insetos nesta fase. Além disso, naqueles momentos, é provável também que a saliva estivesse sendo liberada sob a superfície superior do vaso sanguíneo, ou dentro do mesmo, o que impedia sua visualização. Visto que o vaso é cilíndrico, o fascículo pode realizar a penetração em qualquer área da sua superfície. Perfil semelhante foi observado em *R. prolixus* alimentando-se em camundongos. A atividade da bomba cibarial ocorreu simultaneamente à ejeção de saliva. Porém, diferentemente dos cimicídeos, ao mesmo tempo em que a saliva é liberada, ela é ingerida com o sangue no processo de sucção dos triatomíneos. Assim, quando a frequência da bomba cibarial diminui, menos saliva é ingerida pelo inseto e sua concentração aumenta no interior do vaso sanguíneo (Soares et al. 2006).

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que o processo de alimentação de *C. lectularius* consiste em um mecanismo complexo, sendo necessário a participação tanto dos componentes mecânicos (movimento do fascículo e contrações da bomba cibarial) quanto dos salivares. Na saliva destes insetos, já foram identificadas e caracterizadas uma variedade de moléculas farmacológicas indispensáveis na contraposição da resposta hemostática do hospedeiro (agregação plaquetária, constrição do vaso e a coagulação do sangue), com indicativos de que a NP e o NO estejam entre as mais importantes. Nessa perspectiva, para que seja elucidado o impacto das biomoléculas salivares nos processos de alimentação e salivação de *C. lectularius*, estudos adicionais serão realizados utilizando a técnica de silenciamento da expressão gênica.

7. CONCLUSÕES

- As fêmeas de *Cimex lectularius* canulam tanto as arteríolas (59,7%) quanto as vênulas (43,2%) durante o processo alimentar na pele da orelha de camundongos *hairless*. O momento inicial de canulação do vaso sanguíneo provoca uma contração transitória da sua parede, seguida de constante pulsação, observando-se vasodilatação ao final do repasto sanguíneo. As hemorragias (37%) foram observadas nas arteríolas e também nas vênulas, ocorrendo logo após a retirada das peças bucais do vaso sanguíneo.
- A utilização da microscopia intravital simultaneamente ao eletromiograma da bomba cibarial, confirmou que os sinais elétricos identificados durante o ingurgitamento são referentes à contração dos músculos associados à parede da bomba cibarial.
- O conteúdo das glândulas salivares principais de *Cimex lectularius* marca-se de forma fluorescente utilizando o fluorocromo Laranja de Acridina 0,05%.
- A salivação de *Cimex lectularius* ocorre durante todo o processo de alimentação. Na fase de sondagem, a saliva é liberada continuamente e em maior quantidade. Diferentemente, na fase de ingurgitamento a saliva é liberada em pequenas quantidades e de forma irregular.
- Na fase de ingurgitamento, a salivação ocorre, principalmente, próximo à região de inserção das peças bucais.
- Durante a fase de ingurgitamento, a sucção do sangue ocorre de forma simultânea e independente à liberação de saliva.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen JF, Ding XD, Balfour C, Shokhireva TK, Champagne DE, Walker FA, Montfort WR 2000. Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. *Biochemistry* 39(33): 10118-31.

Araújo RN, Costa FS, Gontijo NF, Gonçalves TCM, Pereira MH 2009. The feeding process of *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) and *Cimex hemipterus* (Fabricius 1803) on different bloodmeal sources. *Journal of Insect Physiology* 55: 1151–1157.

Araújo RN, Gontijo NF, Guarneri AA, Gontijo AF, Soares AC, Pereira MH 2011. Electromyogram of the cibarial pump and the feeding process in hematophagous Hemiptera. In: J. M (Ed.), *Adv. Appl. Electromyogr., InTech, Rijeka*, pp. 137–158.

Balvín O, Chajma P, Naylor R 2019. Age structure of bed bug (Heteroptera:Cimicidae) aggregations affects the nymphal feeding success. *Parasites Vectors* 12: 400.

Balvín O, Munclinger P, Kratochvíl L, Vilímová J 2012. Mitochondrial DNA and morphology show independent evolutionary histories of bedbug *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae) on bats and humans. *Parasitology Research* 111: 457-69.

Bennet-Clark HC 1963. Negative pressures produced in the pharyngeal pump of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol* 40: 223–229.

Bernardes Filho F, Quaresma MV, Avelleira JCR, Azulay DR, Azulay-Abulafia L, Bastos AQ, Gonçalves TCM 2015. Bed bug dermatitis, description of two cases in Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol.* 90(2): 240-3.

Boase C 2001. Bedbugs: back from the brink. *Pesticide Outlook* 12(4): 159-62.

Bocalini SS 2015. Identificação de métodos e produtos utilizados, bem como o perfil das empresas especializadas no controle de vetores e pragas urbanas, com ênfase em percevejos de cama (Hemiptera: Cimicidae) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

- Booth W 2019. Evolution: bedbugs evolved before their assumed ancestral host. *Current Biology* 29: R403–R424.
- Booth W, Balvín O, Vargo EL, Vilímová J, Schal C 2015. Host association drives genetic divergence in the bed bug, *Cimex lectularius*. Original Article.
- Bredt DS, Snyder SH 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 175-95.
- Castrillon MI 2007. Estrutura e ultra-estrutura das glândulas salivares de *Cimex hemipterus* (Fabricius, 1803) (Hemiptera:Cimicidae) [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Cooper R, Wang C, Singh N 2015. Mark-release-recapture reveals extensive movement of bed bugs (*Cimex lectularius* L.) within and between partments. *PLOS ONE* 10(9).
- Cooper R 2006. Bed bugs - still more questions than answers: a need for research and public awareness. *Am Entomol.*:52(2): 111-112.
- Costa GC, Soares AC, Pereira MH, Gontijo NF, Sant'Anna MR, Araújo RN 2016. Physiological characterization of the hematophagy of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) on live hosts. *J Exp Biol.* 219(22): 3656-3664.
- Costa Lima A 1940. Insetos do Brasil. 2º Tomo. Hemípteros. Escola Nacional de Agronomia. Série Didática n° 3, 352p il.
- Curl G 2011. The resurgence and status of bed bugs in the United States. *Pest Control Technology Magazine*: 24–27.
- Dang K, Doggett SL, Singham GV, Lee CY 2017. Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae). *Parasites & Vectors* 10: 318.
- De Simone G, Ascenzi P, di Masi A, Polticelli F 2017. Nitrophorins and nitrobindins: structure and function. *BioMol Concepts* 2017; 8(2): 105–118.
- Delaunay P, Blanc V, Giudice PD, Levy-Bencheton A, Chosidow O, Marty P, Brouqui P 2011. Bedbugs and infectious diseases. *CID*: 52.

- Dickerson, G, Lavoipierre MMJ 1959. Studies on the methods of feeding of bloodsucking arthropods. II. The method of feeding adopted by the bed-bug (*Cimex lectularius*) when obtaining a blood-meal from the mammalian host. *Ann Trop Med Parasitol*, Vol. 53: 347–357.
- Doggett SL, Dwyer DE, Peñas PF, Russell RC 2012. Bed Bugs: Clinical relevance and control options. *Clinical Microbiology Reviews*: 164–192.
- Doggett SL, Geary MJ, Russell RC 2004. The resurgence of bedbugs in Australia: with notes on their ecology and control. *Environ Health* 4: 30-8.
- Figueiredo JVA 2018. Atualização dos conhecimentos sobre o percevejo de cama *Cimex lectularius* (Hemiptera:Cimicidae) – proposta para um Guia de Vigilância e Controle [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo – FSP/USP.
- Forattini, OP 1990. Os cimicídeos e sua importância em saúde pública (Hemiptera-Heteroptera: Cimicidae). *Revista de Saúde Pública* 24: 1-37.
- Francischetti IMB, Calvo E, Andersen JF, Pham VM, Favreau AJ, Barbian KD, Romero A, Valenzuela JG, Ribeiro JMC 2010. An insight into the sialome of the bed bug, *Cimex lectularius*. *J Proteome Res*. 9(8): 3820–3831.
- Goddard J, deShazo R 2009. Bed Bugs (*Cimex lectularius*) and Clinical Consequences of Their Bites. *JAMA* 301(13): 1359.
- Gries R, Britton R, Holmes M, Zhai H, Draper J, Gries G 2015. Bed Bug aggregation pheromone finally identified. *Angew Chem* 127: 1151–1154.
- Griffiths RB, Gordon RM 1952. An apparatus which enables the process of feeding by mosquitoes to be observed in the tissues of a live rodent; together with an account of the ejection of saliva and its significance in Malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 311–319.
- 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. *Journal of Insect Physiology* 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.
- Henry T. 2009. Biodiversity of Heteroptera. *Insect Biodiversity: Science and Society Edited by Robert G. Foottit and Peter H. Adler. Oxford, UK.*
- Ho D, Lai O, Glick S, Jagdeo J 2016. Lack of evidence that bedbugs transmit pathogens to humans. *J. Am. Acad. Dermatol.* Volume 74, Number 6.
- Honig PJ 1986. Arthropod bites, stings and infestations: Their prevention and treatment. *Pediatr. Dermatol.* 3: 189-197
- How YF, Lee CY 2010. Effects of life stages and feeding regimes on active movement behavior of the tropical bed bug, *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 47: 305–12.
- Hwang SW, Svoboda TJ, De Jong IJ, Kabasele KJ, Gogosis E 2005. Bed bug infestations in na urban environment. *Emerging Infectious Diseases* 11: 4.
- Johnson CG 1941. The ecology of the bed-bug, *Cimex lectularius* L., in Britain. *Department of Entomology, London School of Hygiene and Tropical Medicine*, 41(4).
- Júnior DGM, Serra CMB, Moutinho FFB, Pontes LRA 2015. Infestation by *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae) at a rural school in the Municipality of Duas Barras, in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a case report. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 22, n. 2, p. 89-91.
- Kolb A, Needham GR, Neyman KM, High WA 2009. Bedbugs. *Dermatologic Therapy* 22: 347–352.
- Lage MR 2014. Descrição das infestações e estudo morfométrico de percevejos de cama (Hemiptera: Cimicidae) do estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
- Lai O, Ho D, Glick S, Jagdeo J 2016. Bed bugs and possible transmission of human pathogens: a systematic review. *Arch Dermatol Res* 308: 531–538.
- Lavoipierre MMJ., Dickerson G, Gordon RM 1059. Studies on the methods of feeding of blood sucking arthropods: I-The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as

observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effect of the bite on human volunteers. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 53, p. 235-252.

Lehane MJ 2005. The biology of blood-sucking in insects, second edition. *Cambridge University Press, New York, NY, 336 pp.*

Leverkus M, Jochim RC, Scha S, Brocker E, Andersen JF, Valenzuela JG, Trautmann A 2006. Bullous Allergic Hypersensitivity to bed bug bites mediated by IgE against salivary nitrophorin. *J Invest Dermatol.*126: 91–96.

Magalhães O 1949. Profilaxia do tifo exantemático neotrópico no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 47 (1-2): 249-259.

Masetti M, Bruschi F 2007. Bedbug infestations recorded in Central Italy. *Parasitol Int* 56(1): 81–3.

Masini P, Zampetti S, Miñón Llera G, Biancolini F, Moretta I, Romani R, Tramontana M, Hansel K, Stingeni L 2019. Infestation by the tropical bedbug *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae): first report in Italy. *European Academy of Dermatology and Venereology*.

Nagem RL, Williams P 1992. Susceptibility tests of the bed-bug *Cimex lectularius* L. (Hemiptera, Cimicidae) to DDT in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Rev. Saúde públ., S. Paulo*, 26(2): 125-8.

Nascimento LGG, Marques TC, Junior WC, Soares Barata JMS 2013. Characteristics of bed bug (Hemiptera: Cimicidae) infestations in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, between 2004 and 2009. *Trends in Entomology*: 9.

Negromonte MRS, Linardi PM, Nagem RL 1991. *Cimex lectularius* L., 1758 (Hemiptera:Cimicidae): Sensitivity to comercial insecticides in labs. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 86(4): 491-492

Niz M, Meehan GR, Brancucci NMB, Marti M, Rotureau B, Figueiredo LM, Frischknecht F 2019. Intravital imaging of host–parasite interactions in skin and adipose tissues. *Cellular Microbiology*, 21: e13023.

Paim R.M, Araújo RN, Soares AC, Lemos LC, 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: 765e773.

Paim RMM, Nascimento BWL, Nascimento AMD, Pacheco DE, Soares AC, Araújo RN, Sant'Anna MRV, Pessoa GCD, Gontijo NF, Pereira MH 2017. Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface. *Scientific Reports*, 7: 16036.

Panagiotakopulu E, Buckland PC 1999. *Cimex Lectularius* L., the common bed bug from pharaonic Egypt. *Antiquity* 73: 908-911.

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

Pinto, C 1930. Artrópodes parasitos e transmissores de doenças. Rio de Janeiro, Pimenta de Melo & Cia: 295p.

Potter MF 2011. The history of bed bug management - With lessons from the past. *American Entomologist* 57: 1.

Potter MF, Romero A, Haynes KF 2008. Battling bed bugs in the USA. *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests*.

Potter MF, Rosenberg B, Henriksen M 2010. Bugs without borders: defining the global bed bug resurgence. *Pest World* 8–20.

Puri IM 1924. Studies on the anatomy of *Cimex lectularius* L. *Molteno Institute for Research in Parasitology, University of Cambridg*.

Reinhardt K, Siva-Jothy MT 2007. Biology of the bed bugs (Cimicidae). *Annual Review of Entomology* 52: 351–74.

Reinhardt K, Harder A, Holland S, Hooper J, Leake-Lyall C 2008. Who knows the bed bug? Knowledge of adult bed bug appearance increases with people's age in three counties of Great Britain. *J Med Entomol* 45(5): 956-958.

Reinhardt K, Anthes N, Lange R 2015. Copulatory wounding and traumatic insemination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a017582.

- Reinhardt K, Breunig HG, K€onig K 2016. Autofluorescence lifetime variation in the cuticle of the bedbug *Cimex lectularius*. *Arthropod Structure & Development xxx 1e7*.
- Reis MD 2010. An evaluation of bed bug (*Cimex lectularius* L.) host location and aggregation behavior. Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Ribeiro JMC, Garcia ES 1980. The Salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol. Vol. 26*: 303-307.
- Ribeiro JMC, Garcia ES 1981. The role of salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol., v.94*, p.219-230.
- Ribeiro JMC 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Rev. Entomol. 1987. 32*: 463-78.
- Ribeiro JMC, Nussenzveig RH 1993. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *Elsevier Science Pubshers B. V 330(2)*: 165-168.
- Ribeiro JMC, Walker FA 1994. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J Exp Med 180*: 2251-2257.
- Ribeiro JMC, Francischetti IMB 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol. 48*: 73–88.
- Romero A, Potter MF, Haynes KF 2010. Evaluation of chlorfenapyr for control of the bed bug, *Cimex lectularius* L. *Pest Manag Sci 66*: 1243–1248.
- Romero A, Potter MF, Potter DA, Haynes KF 2007. Insecticide resistance in the bed bug: A factor in the pest's sudden resurgence? *Journal of Medical Entomology, 44(2)*: 175-178.
- Roth S, Balvin O, Siva-Jothy MT, Di Lorio O, Benda P, Calva O, Faundez EI, Khan FAA, McFadzen M, Lehnert MP 2019. Bedbugs evolved before their bat hosts and did not co-speciate with ancient humans. *Current Biology 29*: 1847–1853.
- Saenz VL, Santangelo RG, Vargo EL, Schal C 2014. Group living accelerates bed bug (Hemiptera: Cimicidae) development. *Entomological Society of America*.

- Sant'Anna MR, Diotaiuti L, de Figueiredo Gontijo A, de Figueiredo Gontijo N, Pereira MH 2001. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J Insect Physiol* 47: 1459-1465.
- Sheele JM, Crandall C, Chang BF, Arko BL, C, Negrete A 2019. Cimicosis in persons previously fed upon by bed bugs. *Cureus* 11(10): e5941.
- Siljander E, Gries R, Khaskin G, Gries G 2008. Identification of the airborne aggregation pheromone of the common bed bug, *Cimex lectularius*, *J Chem Ecol* 34: 708–718.
- Silva DO 2017. Infestação e controle de *Cimex lectularius* em abrigos públicos no município de Belo Horizonte/MG [dissertação]. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Minas.
- Singh N, Wang C, Cooper R 2015. Role of vision and mechanoreception in bed bug, *Cimex lectularius* L. behavior. *PLoS ONE* 10(3): e0118855.
- Siva-Jothy MT, Zhonga W, Naylor R, Heatona L, Hentleya W, Harneya E 2019. Female bed bugs (*Cimex lectularius* L) anticipate the immunological consequences of traumatic insemination via feeding cues. *PNAS* vol. 116 no. 29.
- Smith JJ, Friend WG 1970. Feeding in *Rhodnius prolixus* responses to artificial diets as revealed by changes in electrical resistance. *J. Insect Physiol* 16: 1709-1720.
- Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, dos Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol* 52: 468-472.
- Soares AC, Araújo RN, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, Pereira MH 2014. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitology International* 63: 229–236.
- Szalanski AL, Austin JW, McKern JA, Steelman CD, Gold RE 2008. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer 1 diversity of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical Entomology* 45, 229-236.
- Tatarnic NJ, Cassis G, Siva-Jothy MT 2014. Traumatic insemination in terrestrial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 245–61.

- Usinguer RL 1966. Monograph of Cimicidae (Hemiptera- Heteroptera). *Maryland: Entomological Society of America.*
- Vail K 2006. Bed bugs: making a comeback in Tennessee, too. Knoxville: *The University of Tennessee* (Extension PB 1763).
- Valenzuela JG, Walker FA, Ribeiro JMC 1995. A Salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. *The Journal of Experimental Biology* 198: 1519–1526.
- Valenzuela JG, Chuffe OM, Ribeiro JMC 1996a. Apyrase salivar and anti-platelet activities from the glands of the bed bug *Cimex lectularius*. *Insect Biochem. Molec. Bid.* 21(6): 557-562.
- Valenzuela JG, Guimaraes JA, Ribeiro JMC 1996b. A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. *Experimental Parasitology* 83: 184–190.
- Valenzuela JG, Ribeiro JMC 1998. Purification and cloning of the salivar nitrophorin from the *Cimex lectularis*. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2659–2664.
- Walker FA 2005. Nitric oxide interaction with insect nitrophorins and thoughts on the electron configuration of the {FeNO}⁶ complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99: 216–236.
- Zorrilla-Vaca A, Silva-Medina MM, Escandón-Vargas K 2015. Bedbugs, *Cimex* spp.: their current world resurgence and healthcare impact. *Asian Pac J Trop Dis* 2015; 5(5): 342-352.
- Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A 1999. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. *J. Neurochem.*, Vol. 72, No. 2.