

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde

**Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus*  
(Heteroptera: Reduviidae)**

por

Gina Barcelos Pontes

Belo Horizonte  
Novembro/2010

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde

**Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus*  
(Heteroptera: Reduviidae)**

por

Gina Barcelos Pontes

Tese apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Doutor em  
Ciências na área de concentração  
Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientação: Dr. Marcelo G. Lorenzo  
Co- orientação: Dr. Gabriel Manrique

**Belo Horizonte  
Novembro/2010**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P813c Pontes, Gina Barcelos.  
2010

Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae) / Gina Barcelos Pontes. – Belo Horizonte, 2010.

xxiv, 172 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 154 - 172

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Rhodnius*/crescimento & desenvolvimento 3. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia I. Título. II. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Orientação). III. Manrique, Gabriel (Co-Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde

**Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus*  
(Heteroptera: Reduviidae)**

Apresentada por

**Gina Barcelos Pontes**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Marcelo G. Lorenzo (Presidente)

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho

Prof. Dr. Marcos Horacio Pereira

Prof. Dra. Ligia Borges

Suplente: Dra. Alessandra A. Guarneri

Tese defendida e aprovada em: 26/11/2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e no Laboratório de Fisiologia de Insetos, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, UBA/Argentina, sob a orientação do Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, vice-chefe e pesquisador titular desta Instituição, e co-orientado pelo Dr. Gabriel Manrique chefe do Laboratório de Fisiologia de Insetos, Universidade de Buenos Aires, Argentina.

“Não almejo despertar convicção. Almejo estimular o pensamento e perturbar  
preconceitos.”

Sigmund Freud

Ao Rodrigo

Agradeço ao Centro de Pesquisa René Rachou, à Fundação Oswaldo Cruz, ao Programa de Cooperação Internacional CAPES/MINCyT, à FAPEMIG, ao CNPq e ao INCT de Entomologia Molecular pelo suporte financeiro.



Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que compartilharam seus conhecimentos comigo para fazer possível a conclusão dessa tese.

Ao Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, na qualidade de orientador da tese, que há sete anos vem guiando a minha formação, não somente acadêmica, senão como pessoa. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a tese, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade. Agradeço, sobretudo, o privilégio de haver trabalhado em um tema para o qual você tanto vem contribuindo.

Ao Dr. Gabriel Manrique por ter assumido a co-orientação desta tese, tendo-me brindado com importante colaboração na discussão do trabalho.

À Dra. Liléia Diotaiuti, que me deu seu incentivo em momentos diversos e de forma incondicional, contribuindo para esta concretização.

À Dra. Alessandra Guarneri, meus agradecimentos pela pronta disposição para discutir sobre os ensaios, bem como por seus questionamentos e contribuições na etapa de análise dos dados.

Aos membros da banca examinadora, por dedicarem seu tempo à leitura e correção deste trabalho.

Sou profundamente grata à amiga e colega Dra. Raquel Ferreira, pela indescritível solidariedade e afeto inestimável, que se traduziram sempre em entusiasmadas e cúmplices conversas na hora do almoço. Muito obrigada pelo continuado estímulo e valiosa parceria. Você sempre será uma grande amiga!

Agradeço afetosamente à amiga Claudia A. Zacharias pela prestimosa e indispensável colaboração em muitos momentos ao longo desse período.

À Maria Inês, pela constante ajuda nos serviços burocráticos e impressão da tese.

Aos demais amigos e companheiros do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Fernando, Dr. João Carlos, Adriana, Rita, Ademilson, Silvia, Juliana, Dona Maria, Carlota, Christiane, Elisa, José Eloy, Maria Raquel, Grasielle, João Paulo, João Victor, Thessa, Guilherme, Letícia e Newmar pelo grande carinho e atenção.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Insetos da Universidade de Buenos Aires, Dra. Alicia Lorenzo-Figueiras, Dra. Romina Barrozo, Dr. Sebastian Minolli, Dr. Pablo Schilman, Dr. Gabriel Manrique, Claudia Zacharias, Florencia

Palottini, Javier Jamui e Carmen Rolandi pela convivência prazerosa. *¡Muchas Gracias Chicos!*

À Biblioteca do CPqRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos colegas da pós-graduação, em especial ao Fernando e a Patrícia pela amizade linda e sincera.

À pós-graduação, em especial as secretárias Cris e Andrea, pela constante ajuda e apoio.

A minha mãe, Antonia, o mais profundo agradecimento por suas sábias lições de esperança e vida. Sem dúvida, a mulher mais incrível que conheci.

A meu pai, Geraldo, por ter me ensinado que sonhar pode ser lindo e que às vezes é necessário ter os pés fora do chão.

As minhas irmãs, Kelly, Paty e Tchan, que trazem tanta luz e gosto para minha vida, sinto por vocês um amor especial. Vocês são a lição mais profunda que vivi de ética, dignidade e amor...

Pedro, *Titi* te ama.

A família Sinistro e Martinic por me adotarem com tanto amor e carinho.

Ao Noño. Foi só um ano de convivência que me encheu de amor por toda vida.

*A mi esposo Rodrigo, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante. Su comprensión y paciente espera para que pudiera terminar la tesis son evidencia de su gran amor. ¡Gracias!*

Ao Benício por existir.

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b>	xiv
<b>Lista de Tabelas</b>	xxi
<b>Lista de Abreviaturas</b>	xxii
<b>Resumo</b>	xxiii
<b>Abstract</b>	xxiv
<b>1 Introdução</b>	<b>25</b>
1.1 <i>Rhodnius prolixus</i> e a doença de Chagas	26
1.2 Detecção de informação e o conceito biológico de comunicação	29
1.3 Comunicação sexual e reprodução em insetos	30
1.4 Comunicação química	32
1.5 Comportamento sexual em triatomíneos: Função das glândulas exócrinas	32
1.6 O uso de abrigos em triatomíneos	38
1.7 Estudos de olfatometria	41
1.8 O vôo em triatomíneos	43
<b>2 Objetivos</b>	<b>46</b>
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos específicos	47
<b>3 Materiais e Métodos</b>	<b>49</b>
3.1 Dinâmica de uso de abrigos em adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> : a atividade locomotora modulada por sinais sexuais	50
3.1.1 Insetos	50
3.1.2 Desenho experimental	51
3.1.3 Registro e análise do comportamento	53
3.1.4 Análise estatística	55
3.2 Ativação e orientação durante o início do voo de <i>Rhodnius prolixus</i> frente a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto	56
3.2.1 Insetos	57
3.2.2 Séries experimentais	58

3.2.3	Dispositivo experimental	58
3.2.4	Análise estatística	61
3.3	Orientação modulada por odor durante a locomoção de adultos de <i>Rhodnius prolixus</i>	62
3.3.1	Insetos	62
3.3.2	Registro das trajetórias	62
3.3.3	Orientação e fontes de odor	64
3.3.4	Análise dos dados	67
3.4	Agregação sexual em <i>Rhodnius prolixus</i>	69
3.4.1	Insetos	69
3.4.2	Desenho experimental	70
3.4.3	Análise dos dados	70
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>73</b>
4.1	Dinâmica de uso de abrigos em adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> : a atividade locomotora modulada por sinais sexuais	74
4.2	Ativação e orientação durante o início do voo de <i>Rhodnius prolixus</i> frente a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto	83
4.3	Orientação modulada por odor durante a locomoção de adultos de <i>Rhodnius prolixus</i>	94
4.4	Agregação sexual em <i>Rhodnius prolixus</i>	100
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>112</b>
5.1	Dinâmica de uso de abrigos em adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> : a atividade locomotora modulada por sinais sexuais	113
5.2	Ativação e orientação durante o início do voo de <i>Rhodnius prolixus</i> frente a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto	116
5.3	Orientação modulada por odor durante a locomoção de adultos de <i>Rhodnius prolixus</i>	119
5.4	Agregação sexual em <i>Rhodnius prolixus</i>	121
5.5	Considerações Finais	124
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>Anexos</b>	<b>129</b>
7.1	Zacharias CA, Pontes GB, Lorenzo MG, Manrique G. Flight initiation by male <i>Rhodnius prolixus</i> is promoted by female odors. J Chem Ecol. 2010 Apr;36(4):449-51. Epub 2010 Mar 30. PubMed PMID: 20352301.	130

7.2 Artigo 2: Gina B. Pontes, Marcelo G. Lorenzo. Female Metasternal Gland Odors Mediate Male Aggregation In <i>Rhodnius Prolixus</i> . <i>Submitted in Medical and Veterinary Entomology.</i>	134
<b>8 Referências Bibliográficas</b>	154

## Lista de figuras

- Figura 1** Distribuição geográfica (A) de *Rhodnius prolixus* (B). Adaptado de Monteiro et al., (2003). **28**
- Figura 2** Glândulas metasternais dos Heteroptera. 1-*Corixa*; 2-*Limnotrechus thoracicus*; 3-*Salda litorallis*; 4-*Anthocoris nemoralis*; 5-*Dysdercus howardi*; 6- *Cimex lectularius*; 7-*Nabis lativentris*; 8-*Scolopostheus affinis*; 9-*Rhodnius prolixus*; 10-*Phytocoris varipes*; 11-*Palomena prasina* (Segundo Brindley, 1930). **37**
- Figura 3** Glândula metasternal de *Rhodnius prolixus*. (a) Desenho esquemático (Segundo Brindley, 1930) e (b) imagem salva mediante uso de microscópio estereoscópico (aumento 62X, Programa Kontron S300, Zeiss, Alemanha). As duas partes da figura destacam um ducto secretor (setas acima) e um reservatório (setas abaixo) da glândula. **38**
- Figura 4** Machos de *Rhodnius prolixus* deixando um abrigo artificial durante o início da escotofase. Tais abrigos são utilizados para estudar a atividade dos insetos no laboratório. **40**
- Figura 5** Início de vôo em um macho de *Rhodnius prolixus*. **45**  
Foto: Rodrigo Sinistro
- Figura 6** Desenho experimental utilizado para o estudo da atividade locomotora de triatomíneos em abrigos artificiais. (A) Arena experimental (40 x 40 x 20 cm). (B) Abrigo artificial (8 x 6 cm), (C) Detalhe do dispositivo de apresentação do estímulo (9,5 x 6,5 cm), normalmente suspenso por um fio de náilon a 15 cm do centro do abrigo, destacando a abertura fechada com tela de arame que ficava voltada para o abrigo. (Adaptado de Lorenzo & Lazzari, 1998). **53**
- Figura 7** Desenho e foto ilustrativos mostrando o abrigo e o par de eixos ortogonais desenhados na tela do monitor do aparelho de televisão utilizados para quantificar a atividade dos insetos. **55**

- Figura 8** Oclusão da glândula metasternal. 1. Localização do orifício de saída de uma glândula metasternal (seta vermelha) junto à coxa das patas traseiras (seta verde). 2. Momento da oclusão com a parafina, destacando a extremidade do microcauterizador (seta vermelha). **58**
- Figura 9** Esquema do desenho experimental utilizado para estudar o início do vôo de *Rhodnius prolixus*. (Adaptado de Minoli & Lazzari, 2006). **59**
- Figura 10** Esquema da arena experimental onde os insetos foram liberados dentro da gaiola de vôo. Os insetos eram liberados dentro da arena e somente podiam deixá-la subindo a haste de madeira e iniciando o voo (Adaptado de Minoli & Lazzari, 2006). **60**
- Figura 11** Desenho experimental utilizado para o registro das trajetórias de adultos de *R. prolixus* frente a correntes de ar associadas a odores de conespecíficos (adaptado de Barrozo et al, 2003).. **66**
- Figura 12** Foto mostrando o círculo de quantificação da agregação sobreposto, apresentando uma fêmea no centro do círculo e um grupo de machos ao redor do casal em cópula. **71**
- Figura 13** Variação do número médio de machos fora do abrigo ao longo do tempo. (●) Atividade espontânea; (○) Atividade de machos na presença de odor de fêmeas. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase. **76**
- Figura 14** Variação do número médios de fêmeas fora do abrigo ao longo do tempo. (●) Atividade espontânea. (○) Atividade de fêmeas na presença de odor de machos. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase. **77**

- Figura 15** Padrão temporal da atividade locomotora de machos de *R. prolixus*. (●) Controle: atividade espontânea; e (○) Experimental: machos estimulados com odor de fêmeas. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase. **79**
- Figura 16** Padrão temporal da atividade locomotora de fêmeas de *R. prolixus*. (●) Controle: atividade espontânea; e (○) Experimental: fêmeas estimuladas com odor de machos. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase. **80**
- Figura 17** Padrão temporal de tentativas de cópula entre machos de *R. prolixus* nas séries: (●) controle: atividade espontânea; e (○) experimental: machos estimulados com odor de fêmeas. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase. **82**
- Figura 18** Macho de *R. prolixus* estimulado com uma corrente de ar transportando odor de fêmeas. Seqüência de fotos tiradas num intervalo de 1 segundo. Foto: Rodrigo Sinistro. **83**
- Figura 19** Freqüência de início de vôo em adultos de *Rhodnius prolixus* (\*Tukey,  $P < 0.05$ ). **85**
- Figura 20** Orientação de *R. prolixus* durante inicio do voo frente a correntes de ar associadas a diferentes estímulos (a posição do estímulo foi convencionalmente designada como 0°). Asteriscos indicam que os dados não apresentaram uma distribuição uniforme e que houve orientação significativa na direção da corrente de ar. \* teste de Rayleigh,  $p < 0,025$ ; teste V  $p < 0,004$ ; \*\*  $p < 0,002$  teste de Rayleigh; teste V  $p < 0,004$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  teste de Rayleigh e teste V. **87**



- Figura 21** Freqüência de início de vôo de machos de *Rhodnius prolixus* 89  
frente a correntes de ar associadas a diferentes fontes de odor (Tukey,  $p < 0,05$ ). Tratamentos: Intacto= odor de fêmeas intactas; GB= odor de fêmeas com os orifícios das GBs ocluidos; GM= odor de fêmeas com os orifícios das GMs ocluidos; GB+GM= odor de fêmeas com os orifícios das GBs e GMs ocluidos; sham= odor de fêmeas tratadas com parafina sem ocluir os orifícios das glândulas exócrinas.
- Figura 22** Freqüência de início de vôo de machos de *Rhodnius prolixus* 91  
frente a correntes de ar associadas a diferentes fontes de odor (Tukey,  $p < 0,05$ ). Tratamentos: Intacto= odor de fêmeas intactas; Glândulas= *pool* de 10 GMs; Controle tecido e cutícula= 10 amostras de tecido e cutícula.
- Figura 23** Freqüência e direção do início de vôo de machos de *R. prolixus* 93  
em relação aos diferentes estímulos apresentados. \*\*dados distribuídos não uniformemente, i.e. orientação (teste de Rayleigh,  $P \leq 0.05$ ). A orientação ocorreu sempre em direção à corrente de ar (teste V,  $P \leq 0.05$ ) Controle sham= correntes de ar associadas com odor de fêmeas tratadas com parafina sem ocluir glândulas exócrinas. Fêmea GM Ø GB O = correntes de ar associadas com odor de fêmeas com GMs ocluídas com parafina. Fêmea MG O BG Ø = odor de fêmeas com glândulas de Brindley (GB) ocluídas. Fêmea MG O BG Ø = odor de fêmeas com GMs e GBs ocluídas. Glândulas = amostra de 10 GMs. Cutícula e tecido = controle de peças de cutícula e tecidos internos.

**Figura 24** Exemplos de trajetórias individuais: (A)- Fêmea confrontada com duas correntes de ar limpo. (B)- Fêmea confrontada com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de fêmea. (C)- Fêmea confrontada com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de macho, e (D)- Fêmea confrontada com uma corrente de ar limpo vs outra com odor de camundongo. (E)- Macho confrontado com duas correntes de ar limpo. (F)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de macho. (G)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de fêmea. (H)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs outra associada a odor de fêmeas que tiveram GMs ocluídas com parafina. (I)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs e outra associada com odor de fêmeas tratadas com parafina, mas sem ocluir as GMs. **95**

**Figura 25** Orientação de fêmeas de *R. prolixus* frente a correntes de ar associadas a diferentes estímulos olfativos. O índice de orientação ( $IO = \cos \alpha_{m,r}$ ) é representado para as diferentes séries experimentais: 1 indica orientação na direção da corrente de ar associada à fonte de odor e, -1 indica orientação na direção oposta. Os histogramas circulares representam a distribuição de frequência dos ângulos médios exibidos nas trajetórias dos insetos. Como convenção, a direção do estímulo foi atribuída ao ângulo de  $0^\circ$ . Diferentes letras denotam diferenças estatisticamente significativas, ANOVA,  $p < 0,0001$ ). **98**

- Figura 26** Orientação de machos de *R. prolixus* frente a correntes de ar associadas a diferentes estímulos olfativos. O índice de orientação ( $IO = \cos\alpha_{m.r}$ ) é representado para as diferentes séries experimentais: 1 indica orientação na direção da corrente de ar associada à fonte de odor e, -1 indica orientação na direção oposta. Os histogramas circulares representam a distribuição de frequência dos ângulos médios exibidos nas trajetórias dos insetos. Como convenção, a direção do estímulo foi atribuída ao ângulo de  $0^\circ$ . Diferentes letras denotam diferenças estatisticamente significativas, Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ). **99**
- Figura 27** Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1F: 4 machos e uma fêmea intacta (n=9). **101**
- Figura 28** Número médio de fêmeas agregadas ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4F:1M: 4 fêmeas e um macho intacto (n=9). **102**
- Figura 29** Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1M: 4 machos e um macho intacto (n=9). **103**
- Figura 30** Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1FMG: 4 machos intactos e uma fêmea com os orifícios das GMs ocluídos (n=6). **105**
- Figura 31** Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1Fsham: 4 machos intactos e uma fêmea tratada com parafina, sem ocluir os orifícios das GMs (n=9). **106**
- Figura 32** Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4Mmt:1F: 4 machos com os orifícios das GMs ocluídos e uma fêmea intacta (n=6). **107**

**Figura 33** Sequência comportamental de machos de *Rhodnius prolixus* em diferentes condições experimentais. (A) Comportamento de agregação de machos frente a uma cópula com fêmea intacta (4 machos/1 fêmea). (B) Ausência de agregação de machos quando a fêmea apresentou as GMs ocluídas (4 machos/1 fêmea GMs ocluídas).

## Lista de Tabela

<b>Tabela 1</b>	Parâmetros do comportamento sexual de <i>Rhodnius prolixus</i> nos diferentes grupos experimentais.	<b>110</b>
-----------------	---	------------

## Lista de Abreviaturas

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APC</b>	Associação pós-cópula
<b>GB</b>	Glândula de Brindley
<b>GM</b>	Glândula metasternal

## Resumo

Este estudo descreveu a dinâmica de uso de abrigos em adultos de *Rhodnius prolixus* evidenciando que a saída dos abrigos e a atividade locomotora dos machos são moduladas por sinais olfativos sexuais emitidos por fêmeas. Adicionalmente, foram analisadas a frequência de início do voo, e a atividade locomotora durante a marcha, a fim de avaliar as hipóteses de que haveria ativação e orientação mediante sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto. Além disso, verificamos o comportamento de agregação de machos ao redor de casais em cópula. Os odores das fêmeas foram capazes de induzir a saída dos machos dos abrigos, além de aumentar a atividade locomotora destes. Odores de fêmeas originados das glândulas metasternais promoveram um aumento na frequência de início do voo de machos de *R. prolixus*. Além disso, estes sinais olfativos modularam a orientação anemotática observada durante a marcha dos machos. Nossos achados demonstraram que na ausência dos odores das glândulas metasternais de fêmeas, o comportamento de agregação dos machos durante a cópula é drasticamente afetado. Desta forma, concluímos que os odores produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas são de grande relevância no comportamento sexual de *R. prolixus*, já que na ausência destes, alguns mecanismos que medeiam o comportamento sexual desta espécie foram prejudicados.

## Abstract

This study described the dynamics of the use of shelters by adult *Rhodnius prolixus* showing that male activation in shelters and subsequent locomotor activity are induced by olfactory signals emitted by females. We analyzed both flight initiation frequency and orientation during locomotion, considering that insects should activate and engage in oriented responses if chemical signals were emitted by individuals of the opposite sex. Furthermore, we evaluated the aggregation behavior of males to search for the source of the chemical signal. Female odors were able to induce males to leave their shelters and increased their locomotor activity. Female odors originated in metasternal glands promoted an increase in take-off frequency in males. Moreover, these olfactory signals were also relevant for the expression of an anemotactic response by walking males. Our findings suggest that in the absence of female metasternal gland odors, the aggregation behavior of males during copulation is not expressed. Thus, we conclude that the odors produced by glands metasternal are a key set of signals mediating the sexual behavior of *R. prolixus*.



# Introdução

---

## 1 Introdução

### 1.1 *Rhodnius prolixus* e a doença de Chagas

Os triatomíneos são insetos hemimetábolos pertencentes à ordem Hemiptera (Reduviidae: Triatominae) e exclusivamente hematófagos em todas suas fases de vida (Lent & Wygodzinsky, 1979). Os seus principais hospedeiros são vertebrados de diversas classes, mas fundamentalmente aqueles endotérmicos. Estes insetos apresentam grande relevância por serem os vetores da doença de Chagas (Chagas, 1909; Lent & Wygodzinsky, 1979; Zeledón & Rabinovich, 1981). O agente etiológico desta enfermidade é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é normalmente transmitido pelos insetos através das fezes liberadas sobre a pele dos seres humanos durante o seu repasto sanguíneo (Chagas, 1909; Zeledón & Rabinovich, 1981). A doença de Chagas é um dos principais problemas de saúde pública no continente americano, já que o seu ciclo silvestre está restrito a esta região. Esta zoonose atualmente acomete oito milhões de pessoas, enquanto outras 100 milhões vivem em áreas onde há risco de contrair a doença por via vetorial (Coura & Dias, 2009).

A transmissão vetorial responde por 80% dos casos de doença de Chagas em zonas rurais da América Latina. O restante da transmissão do parasito ocorre por outras vias, tais como a transfusão sanguínea ou a transmissão congênita e, inclusive, ocasionalmente, através de transplantes de órgãos, ingestão de alimentos contaminados ou acidentes em laboratório (Dias, 1987).

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), *T. cruzi* é encontrado em mamíferos silvestres, sendo transmitido nesses ambientes por diversas espécies de triatomíneos. A colonização das habitações humanas por triatomíneos

provavelmente ocorre como consequência da degradação dos habitats naturais destes insetos, que assim seriam forçados a procurar novas fontes de alimento. No habitat artificial estes insetos conseguem estabelecer colônias facilmente, já que as mesmas são sustentadas pela grande oferta de alimento e abrigos. Desta maneira, promove-se o desenvolvimento do ciclo doméstico do parasito.

Atualmente há 141 espécies de triatomíneos descritas, que podem ser agrupadas em 18 gêneros (Galvão et al., 2003; Forero et al., 2004; Costa et al., 2006; Costa & Felix, 2007; Sandoval et al., 2007; Martínez et al., 2007; Bérenger & Blanchet, 2007). Embora os insetos de todas essas espécies sejam potenciais vetores da doença, alguns possuem maior importância epidemiológica. Um exemplo é *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Figura 1), o principal vetor doméstico da doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e também em alguns países da América Central (Guatemala, Honduras, Nicarágua, El Salvador).

No habitat silvestre, *R. prolixus* é encontrado em diversas espécies de palmeira, onde comumente se associa com roedores e aves (Lent & Wygodzinsky 1979). Estes animais podem atuar como agentes transportadores na sua dispersão, já que as fêmeas desta espécie colam os ovos em penas ou pêlos no momento da oviposição (Schilman et al., 1996). A sistemática e taxonomia dos insetos pertencentes ao gênero *Rhodnius* tem sido analisada por diversos autores. Gamboa (1963) relata que na Venezuela e Colômbia, são encontradas populações silvestres destes insetos em copas de palmeiras. Segundo esse autor, estes ambientes representam o ecótopo original desta espécie. Ainda, relata que populações domésticas da espécie são comumente encontradas na região. No entanto, Gamboa (1963) também assinala que na América Central, *R. prolixus* parece estar completamente confinado a habitats domésticos e peridomésticos.

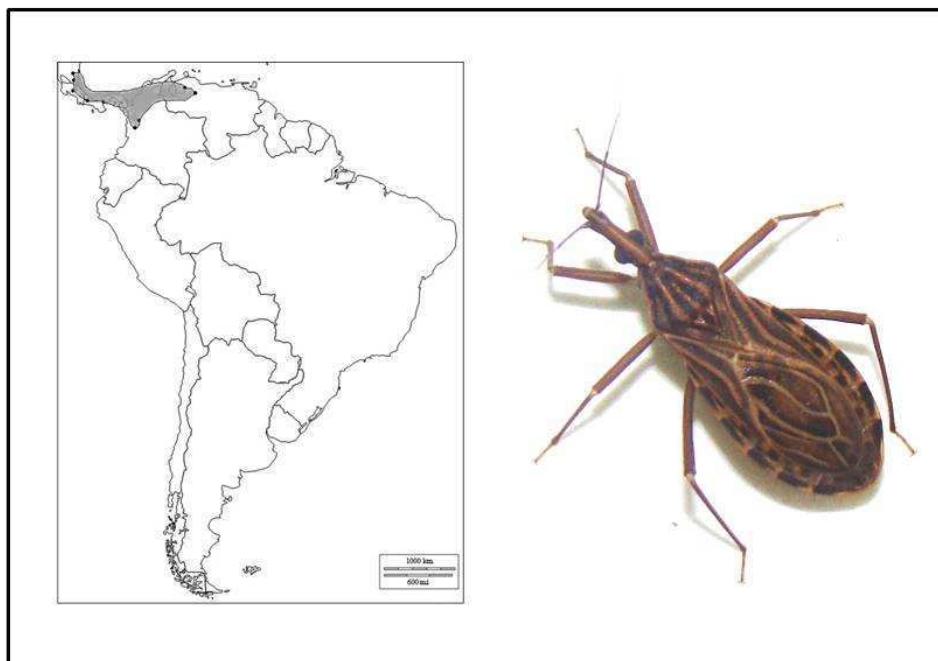


Figura 1 – Distribuição geográfica (A) de *Rhodnius prolixus* (B). Adaptado de Monteiro et al., (2003).

## **1.2 Detecção de informação e o conceito biológico de comunicação**

O processo de obtenção de informação, através dos órgãos sensoriais, é de fundamental importância para a sobrevivência dos seres vivos. A informação é adquirida através de órgãos sensoriais especializados, que a obtêm de maneira seletiva do ambiente. Segundo a teoria da informação (Wiener, 1948; Shannon & Weaver, 1949), a transmissão de informação implica “perda de incerteza”. De acordo com esta teoria, a transmissão de informação requer a interação entre uma fonte, ou emissor, e um receptor. Entre estes existe um canal de transmissão que envolve um movimento de energia ou material a partir da fonte até o receptor. Na área biológica o receptor é um organismo, a fonte é parte do ambiente, circunstancialmente outro organismo da mesma ou de outra espécie, e o canal inclui o estímulo de qualquer modalidade, junto com os fatores ambientais que o afetam. Particularmente, denomina-se estímulo a um padrão de atividade específico dentro do canal de transmissão, que adquire um significado por estar associado a um estado do ambiente que é relevante para o receptor (Dusenbery, 1992). Desta maneira, os sistemas sensoriais detectam somente aqueles eventos que são relevantes para a sobrevivência dos organismos (Dusenbery, 1992).

A troca de informação entre indivíduos de uma mesma espécie é um processo denominado comunicação. O tipo de comunicação depende do canal sensorial envolvido nesta. Sinais visuais, tácteis, auditivos e químicos são utilizados como mediadores da comunicação e, portanto do comportamento. Os órgãos sensoriais, estruturas especializadas, evoluíram para receber tais sinais com alta especificidade e sensibilidade e traduzi-los a uma linguagem de valor neurofisiológico (Chapman, 1998).

### 1.3 Comunicação sexual e reprodução em insetos

Grande parte do sucesso adaptativo dos insetos deve-se a características de sua reprodução e desenvolvimento. Os insetos apresentam estratégias reprodutivas, tais como: viviparidade, partenogênese, pedogênese, poliembrionia e hermafroditismo (Nation, 2002). Geralmente, fêmeas e machos sexualmente maduros devem estar presentes no mesmo local ao mesmo tempo, para que, através do acasalamento, ocorra transferência de espermatozóides e fecundação dos ovócitos. Uma vez que a maioria dos insetos se reproduz de maneira sexuada, muitas espécies desenvolveram mecanismos que medeiam o encontro entre sexos. Estes mecanismos podem se basear na troca de sinais visuais, sonoros, vibratórios, táteis e químicos (Chapman, 1998).

O comportamento sexual dos insetos não termina necessariamente com o primeiro acasalamento. Fêmeas de muitas espécies de insetos aceitam acasalar com mais de um macho (poliândria), estratégia que pode envolver processos de seleção espermática e de avaliação da qualidade genética do macho pela fêmea (Thornhill & Alcock 1983; Simmons, 2001). Quando uma fêmea se re-acasala, a competição espermática pode determinar qual macho vai fertilizar seus ovos. Parker (1970) define competição espermática como a competição no aparelho reprodutor da fêmea entre espermatozoides de dois ou mais machos para fertilizar os ovos. Segundo Thornhill & Alcock (1983), a maioria dos ovos é provavelmente fertilizada pelo espermatozóide procedente do último macho que realizou a cópula, embora as fêmeas possam influenciar qual espermatozóide fertilizará seus ovos (Eberhard, 1996).

Uma maneira na qual os machos podem reduzir a chance de sua parceira aceitar o espermatozóide de outro macho é formando associações pós-acasalamento (APA) (Alcock, 1994). Os machos podem guardar a fêmea de diferentes formas após um acasalamento: mecanicamente ou quimicamente. Este comportamento visa prevenir

que a fêmea copule com outros machos durante um período de tempo, para assegurar que seu esperma seja utilizado para fertilizar os ovos e evitar que o esperma de um macho competidor o substitua (Thornhill & Alcock 1983; Alcock, 1994). Em algumas espécies de insetos, os machos fornecem nutrientes para as fêmeas durante a transferência de esperma. Estes nutrientes podem causar um aumento (temporal) na produção de ovos pelas fêmeas. Neste caso, o fornecimento de nutrientes pelo macho pode ser considerado como um esforço por fertilizar o maior número de ovos possível antes que a fêmea se re-acasale (Vahed, 1999). Neste sentido, o comportamento sexual do macho e da fêmea, antes, durante e após o acasalamento, determina em grande parte seu sucesso reprodutivo. Pelos motivos listados, considera-se que normalmente existe um conflito entre as estratégias reprodutivas de machos e fêmeas, já que ambos perseguem objetivos comumente contrapostos (Arnqvist & Nilsson, 2000).

O comportamento sexual dos insetos pode ser dividido nas seguintes fases sucessivas: (1) atração a longa distância mediante vôo, (2) atração a curta distância mediante marcha, (3) corte e (4) acasalamento. Essas fases podem ou não fazer parte do comportamento sexual das diferentes espécies de insetos. Quando os adultos não se encontram próximos uns dos outros, é freqüente que indivíduos de um dos sexos sejam capazes de localizar seus parceiros por meio de sinais visuais, químicos e/ou acústicos (Lewis, 1984). Usualmente, somente um dos sexos emite sinais para atrair o outro. Sinais químicos são especialmente mais efetivos para atrair parceiros sexuais a longa distância (Cardé & Bell 1995; Cardé & Minks 1997). Após a localização do parceiro, o comportamento de corte pode preceder ou ser parte de um acasalamento. Quando o acasalamento é bem sucedido, a sequência comportamental resultará em transferência de espermatozoides (Groot, 2000).

#### **1.4 Comunicação química**

Quando um sinal químico somente atrai indivíduos de um dos sexos da espécie é chamado feromônio sexual. A produção e liberação do feromônio sexual pelo organismo emissor e sua resposta no receptor dependem da idade, período de acasalamento, estado fisiológico e fatores ambientais (McNeil, 1991; Raina et al. 1992, 1994; Landolt & Philips, 1997). Nos insetos, os feromônios são frequentemente misturas multicomponentes (Karlson & Luscher 1959) que podem, em certos sistemas, funcionar sinergicamente. Os feromônios, nos insetos, podem também variar entre populações da mesma espécie separadas geograficamente (Miller & Roelofs, 1980).

O encontro e o reconhecimento entre os sexos, na maioria dos insetos, são mediados por feromônios sexuais que podem ser produzidos pela fêmea ou pelo macho. Os feromônios desencadeiam reações comportamentais no sexo oposto e podem atraí-lo de longas distâncias, reunindo vários indivíduos em torno do emissor (Shorey, 1973). Após a aproximação, outros tipos de sinais químicos podem estimular o corte e a cópula. Estes sinais podem estar localizados na cutícula ou serem voláteis e, podem ser produzidos por glândulas exócrinas (Lang & Foster, 1976). Sinais visuais, sonoros e tácteis também podem estimular o comportamento de corte e cópula.

#### **1.5. Comportamento sexual em triatomíneos: Função das glândulas exócrinas**

Estudos sobre o comportamento e a comunicação química em triatomíneos vetores da doença de Chagas podem ser de grande relevância no desenvolvimento de ferramentas de controle vetorial. A existência de feromônios sexuais em insetos da subfamília Triatominae tem sido sugerida em poucos trabalhos que ressaltam a importância de novos estudos nesta área.



Brindley (1930) descreveu as “glândulas do primeiro segmento abdominal” dos Heteroptera, que foram denominadas por estes como “glândulas de Brindley” (GBs). No mesmo trabalho a autora descreveu a morfologia de um segundo tipo glandular, ao que denominou glândulas metasternais (GMs Figura 2). O artigo citado (Brindley, 1930) incluiu a descrição das glândulas metasternais de *Rhodnius prolixus*, que é a espécie modelo deste estudo (Figura 3). Os adultos da subfamília Triatominae apresentam os dois pares de glândulas exócrinas, as GMs (localizadas no metatorác ventral e as GBs situadas no abdômen e cujo ducto abre no metatórax dorsolateral (Brindley, 1930). Estudos realizados com *Triatoma infestans* e *Triatoma rubrovaria* também descreveram áreas glandulares associadas com a genitália de machos que poderiam estar envolvidas na produção de substâncias voláteis (Barth, 1980; Weirauch, 2003) e que estão ausentes nas ninfas. Porém, até o presente a produção de substâncias voláteis por parte dessas glândulas dos machos não tem sido demonstrada. Os Triatominae não parecem ter outros tipos de glândulas exócrinas, tais como as glândulas abdominais e ventrais encontradas em outros insetos da família Reduviidae (Kalin & Barret, 1975; Schofield, 1979; Rossiter & Staddon, 1983).

Segundo Rossiter & Staddon (1983), a secreção das GMs de *Dipetalogaster maximus* é composta por uma única substância, a 3-metil-2-hexanona. Segundo esses autores, o composto poderia atuar como sinal de alarme ou defesa, tendo a função de repelir predadores ou informar aos conespecíficos da existência de perigo. Apesar disso, não foram publicados resultados que permitam comprovar tais hipóteses. Por outro lado, Manrique et al. (2006), Pontes et al. (2008) e Vitta et al. (2009) identificaram os compostos produzidos pelas glândulas metasternais de *T. infestans*, *R. prolixus* e *Triatoma brasiliensis*, respectivamente, e encontraram em todos os casos misturas que incluíam cetonas e álcoois. Além disso, Manrique et al.

(2006) e Pontes et al. (2008) detectaram a liberação de compostos produzidos pelas glândulas metasternais de *T. infestans* e *R. prolixus* durante a cópula, sugerindo o envolvimento das secreções destas glândulas no contexto sexual.

O acasalamento de várias espécies de triatomíneos tem sido estudado em condições de laboratório (Hase, 1932; Sordillo & de Almeida, 1988; Lima et al., 1986; Rojas et al., 1990; Rojas & Cruz-López, 1992; Manrique & Lazzari, 1994; García-Pérez et al., 1997), revelando que estes insetos apresentam um comportamento de cópula simples, sem aparentes mecanismos de corte. Velasquez Antich (1965) descreveu a existência de atração entre machos e fêmeas de *Triatoma pallidipennis* mediada por odor. Ainda, Velazquez Antich (1968) relatou em outro trabalho que machos de *R. prolixus* eram atraídos por fêmeas.

Diversos trabalhos sugerem o uso de sinais químicos de agregação de machos ao redor de casais em cópula em triatomíneos (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1995, De Brito Sánchez et al. 1995). A liberação destes sinais olfativos, capazes de atrair e agregar machos em torno de casais em cópula foi descrita por Baldwin et al. (1971) em *R. prolixus* e Manrique & Lazzari (1995) em *T. infestans*. Porém, a identidade química deste sinal e seu local de produção nunca foram descritos. De Brito Sánchez et al. (1995) apresentaram resultados obtidos em experimentos de eletrofisiologia que sugeriram a existência de um feromônio sexual liberado por um ou ambos os sexos durante o acasalamento de *T. infestans*. Ondarza et al. (1986, 1987) relatam para *Triatoma mazzottii* a existência de um feromônio sexual que atuaria como “afrodisíaco” e seria liberado quando os insetos se encontram copulando.

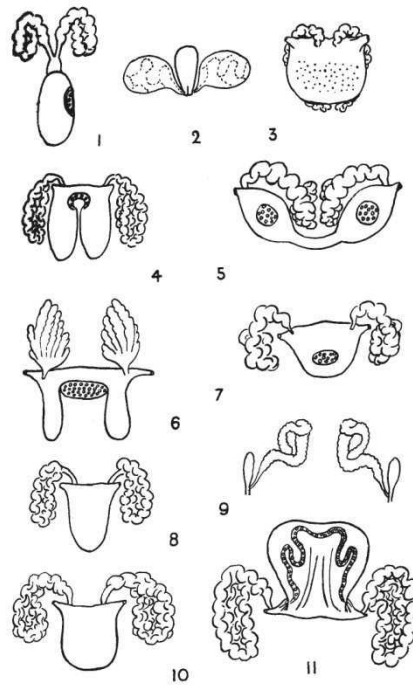
Como mencionado anteriormente, os triatomíneos apresentam dois pares de glândulas exócrinas produtoras de compostos voláteis: as glândulas metasternais (GMs), localizadas no metatoráx ventral, e as glândulas de Brindley, situadas no

metatórax dorsolateral (Kalin & Barret 1975; Rossiter & Staddon, 1983). A origem dos sinais químicos envolvidos na comunicação sexual de triatomíneos tem sido recentemente estudada. Manrique et al. (2006) e Pontes et al. (2008), a partir de experimentos de comportamento e de identificação química dos produtos das GMs de *T. infestans* e *R. prolixus*, sugeriram que estas glândulas estariam envolvidas na comunicação entre sexos. A partir disso, Crespo & Manrique (2007) e Pontes et al. (2008) mostraram que as substâncias emitidas pelas GMs são relevantes para o sucesso da cópula de *T. infestans* e *R. prolixus*, respectivamente.

Insetos adultos perturbados mecanicamente emitem as secreções produzidas pelas GBs. O principal componente desta secreção nas diferentes espécies estudadas é o ácido isobutírico (Games et al. 1974, Cruz López et al. 2001, Rojas et al. 2002, Guerenstein & Guerin 2004, Vitta 2005). Segundo Schofield (1979), esta substância teria função de defesa, agindo contra possíveis predadores. Foi sugerido ainda que, o ácido isobutírico atuaria como feromônio de alarme para outros membros da população (Ward 1981, Manrique et al 2006). Guerenstein & Guerin (2004) sugeriram que esse composto, em baixas concentrações pode funcionar também como um sinal sexual. Coincidentemente, Fontán et al (2002) e Rojas et al. (2002) tem sugerido que odores relacionados com as GBs poderiam atuar como sinais sexuais de triatomíneos. Entretanto, até o momento não há dados experimentais publicados que comprovem a existência de comportamentos desencadeados por estas substâncias que tenham relação direta com o contexto sexual. Cruz-Lopez et al. (1995) analisaram o conteúdo das GMs de *T. infestans* e não encontraram substâncias voláteis.

Como já mencionado, Pontes et al. (2008) descreveram a identidade dos compostos produzidos pelas glândulas metasternais de *R. prolixus* e estabeleceram uma ligação entre estas secreções voláteis e a comunicação sexual dos insetos.

Alguns dos compostos identificados neste trabalho já foram descritos como feromônios de agregação, alarme ou como parte de substâncias de defesa de outras espécies de insetos de diversas ordens como Coleóptera, Hymenoptera e Dytioptera (PheroBase, 2007). Estes dados ressaltam a importância desses compostos como substâncias biologicamente ativas responsáveis, em alguns dos casos, pela transferência de informações entre indivíduos dessas ordens. Além disso, Pontes et al. (2008) demonstraram que alguns dos compostos produzidos pelas GMs são emitidos espontaneamente por adultos virgens dos dois sexos. Porém, esta emissão foi visivelmente mais intensa em fêmeas e se concentrou na fase escura do seu ciclo diário. Dados do mencionado estudo demonstraram também que o sucesso da cópula era drasticamente afetado na ausência de odores produzidos pelas GMs de machos e de fêmeas, separadamente. De acordo com Pontes et al. (2008), isso indicaria que existem processos de reconhecimento sexual entre indivíduos de ambos os sexos mediados por odor. O aprofundamento desses estudos permitirá compreender melhor as interações sexuais nesta espécie e determinar a real relevância dos odores emitidos por fêmeas e machos neste contexto.



METASTERNAL SCENT-GLANDS OF HETEROPTERA.

Figura 2- Glândulas metasternais dos Heteroptera. 1-*Corixa*; 2-*Limnotrechus thoracicus*; 3-*Salda litorallis*; 4-*Anthocoris nemoralis*; 5-*Dysdercus howardi*; 6- *Cimex lectularius*; 7-*Nabis lativentris*; 8-*Scolopostheus affinis*; 9-*Rhodnius prolixus*; 10-*Phytocoris varipes*; 11-*Palomena prasina* (Segundo Brindley, 1930).

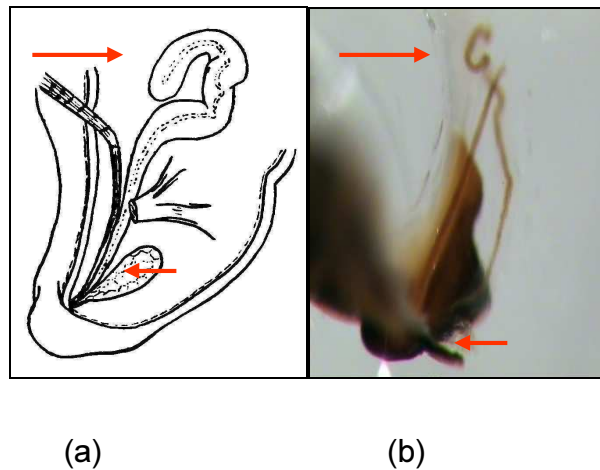


Figura 3- Glândula metasternal de *Rhodnius prolixus*. (a) Desenho esquemático (Segundo Brindley, 1930) e (b) imagem salva mediante uso de microscópio estereoscópico (aumento 62X, Programa Kontron S300, Zeiss, Alemanha). As duas partes da figura destacam um ducto secretor (setas acima) e um reservatório (setas abaixo) da glândula.

### 1.6 O uso de abrigos em triatomíneos

A atividade locomotora (Espínola, 1973; Núñez, 1982; Settembrini, 1984; Lazzari, 1992) e o uso de abrigos (Lorenzo & Lazzari, 1998) têm sido pouco estudados em triatomíneos. Durante o dia, estes insetos estão inativos e são normalmente encontrados no interior de abrigos tais como frestas de paredes, num estado de imobilidade denominado *akinesis* (Wigglesworth, 1950). Os triatomíneos permanecem dentro dos abrigos (Figura 4), em estreito contato com o substrato e com outros membros da população (*tigmotaxia*) formando agregações de insetos. São fatores relevantes para permanecer neste estado a presença de feromônios voláteis e de contato (Lorenzo Figueiras et al., 1994; Lorenzo & Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998) e o contato tátil com conespecíficos. Além disto, a entrada dos triatomíneos aos abrigos é promovida pela sua intensa fototaxia negativa (Reisenman, 1998; Mota, 2006). Adicionalmente, outros fatores, como por

exemplo, a umidade relativa e a densidade de indivíduos, também podem afetar a escolha de abrigos pelos triatomíneos (Lorenzo & Lazzari; 1999; Mota; 2006). A tendência a alojarem-se dentro de abrigos aumenta a probabilidade dos triatomíneos de permanecerem protegidos de possíveis predadores. Durante o início da noite, os triatomíneos podem mostrar períodos de atividade locomotora (Espínola, 1973; Núñez, 1987; Lazzari, 1992), normalmente em busca de alimento (Lorenzo & Lazzari, 1998). De acordo com os últimos autores citados, os insetos apresentam um segundo pico de atividade de busca de abrigo no fim da fase escura. Portanto, a atividade destes insetos segue um padrão bimodal (Settembrini, 1984; Lazzari, 1992), no qual a saída do abrigo acontece no início da escotofase e o retorno ao final da mesma (Lorenzo & Lazzari, 1998).



Figura 4- Machos de *Rhodnius prolixus* deixando um abrigo artificial durante o início da escotofase. Tais abrigos são utilizados para estudar a atividade dos insetos no laboratório.

A presença de um sinal químico de agregação nas fezes de triatomíneos já foi relatada para diversas espécies (Schofield & Patterson, 1987; Ondarza et al. 1986; Cruz-López et al., 1993; Lorenzo Figueiras et al., 1994; Lorenzo & Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras & Lazzari, 2002; Vitta et al., 2002; Pires et al., 2002). Este sinal é acumulado nas proximidades dos abrigos e permite aos insetos o reconhecimento dos mesmos durante a fase final da noite (Lorenzo & Lazzari, 1996; Pires et al., 2002). Além disso, um segundo sinal de agregação, denominado *footprints*, está presente na cutícula de *T.infestans* (Lorenzo Figueiras & Lazzari, 1998), *P.megistus* (Pires et al., 2002) e *Triatoma pseudomaculata* (Vitta et al., 2002) e é capaz de promover a agregação somente através do contato direto.



## 1.7 Estudos de olfatométria

A técnica de olfatométria permite avaliar respostas de comportamento dos insetos que evidenciem orientação quando estes são confrontados com odores transportados por correntes de ar (Carde & Baker, 1984). Bioensaios que permitam demonstrar a modulação da orientação dos insetos mediante substâncias químicas são essenciais para a determinação da identidade de um *infoquímico*, da sua função e dos mecanismos comportamentais desencadeados pela apresentação do estímulo.

Os termos *atração* (resposta positiva) e *repulsão* (resposta negativa) descrevem as respostas locomotoras observadas frente a estímulos que resultam na diminuição ou aumento, respectivamente, da distância entre o organismo receptor e o emissor da mensagem. No caso de estímulos olfativos, a atração geralmente resulta na localização da fonte emissora, enquanto que a repulsão resulta no afastamento do organismo receptor (Dicke & Sabelis, 1988). Estas respostas podem ser direcionadas (*taxis*) ou não-direcionadas (*quineses*). O vento é o principal responsável pela dispersão dos estímulos olfativos e os insetos baseiam-se na direção do vento para se orientar até as fontes de odor. Quando os insetos se orientam utilizando correntes de ar como pistas direcionais, chamamos tal processo de *anemotaxia*. Esta, por sua vez, se divide em *anemotaxia positiva*, que ocorre quando o inseto se orienta contra o vento predominante e *anemotaxia negativa*, quando o inseto se orienta a favor do vento (Dicke & Sabelis, 1988). A quimiotaxia é a orientação guiada pela mudança da concentração de odor e se restringe a uma parcela do ambiente sem movimento da massa de ar, onde o processo de formação de gradientes de odor é lento e dominado por processos de difusão. Em ambientes com correntes de ar, i.e., a maior parte dos ambientes naturais, frequentemente há turbulências que impedem a formação de gradientes de odor. As correntes turbulentas tanto podem carregar os

“filamentos de odor” concentrados, por grandes distâncias (dezenas a centenas de metros), como podem diluir rapidamente a concentração dos filamentos mesmo a poucos centímetros da fonte. Há uma grande influência de variáveis estocásticas nestes processos, o que faz com que a concentração de um odor não seja um parâmetro completamente confiável para os organismos. Chama-se de pluma de odor o conjunto de filamentos arrastados direcionalmente por uma corrente de ar presente no ambiente. A orientação dos insetos nestes ambientes é o resultado de uma mistura de reações quiomiotáticas, optomotoras e anemotáticas, mas a anemotaxia modulada por odor é o mecanismo predominante durante o deslocamento de um inseto dentro de uma pluma de odor (Miller & Roelofs, 1978; Murlis et al., 2000). O termo anemotaxia refere-se ao fato dos insetos utilizarem pistas direcionais somente oferecidas pela direção predominante no fluxo de ar. Diz-se que é modulada por odor, porque o processo anemotático normalmente requer da presença sostenida de um determinado componente volátil, ou de uma mistura, para que o comportamento anemotático seja expresso.

Em triatomíneos, o uso de infoquímicos está relacionado com o reconhecimento e localização de hospedeiros (Núñez, 1987; Taneja & Guerin, 1995), com o encontro de possíveis parceiros para o acasalamento (Baldwin et al., 1971; Manrique & Lazzari, 1995; Vitta et al., 2009), com a sinalização de alarme (Ward, 1981; Manrique et al., 2006), assim como com o comportamento de agregação e busca de abrigos (Schofield & Patterson, 1977; Lorenzo Figueiras et al., 1994; Lorenzo & Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras & Lazzari, 1998).

Estes insetos mostram respostas de anemotaxia positiva, ou seja, orientam-se contra correntes de ar, quando confrontados com correntes que carregam odores associados ao hospedeiro (Núñez, 1982; 1987; Taneja & Guerin, 1995; 1997; Barrozo, 2003, Barrozo et al., 2004; Barrozo et al., 2004). Atração ao CO<sub>2</sub> foi

demonstrada em *R. prolixus* (Núñez, 1982; Taneja & Guerin, 1995) e *T. infestans* (Taneja & Guerin, 1995; 1997; Barrozo et al. 2003, Barrozo et al., 2004). A atração de *T. infestans* por ácido láctico foi observada quando este composto foi apresentado em correntes de ar em associação com CO<sub>2</sub> (Barrozo, 2003). Guerenstein & Guerin (2001), utilizando um compensador de marcha, demonstraram que correntes de ar que apresentavam ácido isobutírico eram capazes de atrair *T. infestans*, enquanto a presença de nonanal nas mesmas condições somente induzia uma ativação dos insetos sem orientação definida. Barrozo (2003) mostrou através de eletroantenografia que *T. infestans* apresenta respostas eletrofisiológicas ao ácido láctico, 1-octen-3-ol e ácidos graxos de cadeia curta, sendo estas respostas dose dependentes. Além disso, a autora demonstrou a existência de anemotaxia positiva em *T. infestans* frente a correntes de ar que apresentam 1-octen-3-ol e também frente a misturas de ácidos graxos de cadeia curta (ácido propanóico, ácido butírico e ácido valérico) com ácido láctico (Barrozo, 2003).

Barrozo et al., (2004) e, posteriormente, Bodin et al., (2008) demonstraram que a expressão da resposta comportamental de *T. infestans* e *R. prolixus* a alguns odores provenientes do hospedeiro é controlada por um relógio endógeno circadiano e que isto ocorre com maior intensidade durante o início da fase escura do ciclo diário.

## **1.8 O voo em triatomíneos**

O voo dos triatomíneos pode apresentar grande importância na epidemiologia da doença de Chagas, uma vez que este representa um mecanismo de dispersão ativa (Sjogren & Ryckman, 1966; Lehane & Schofield, 1976; Vazquez-Prokopec et al., 2004; Ceballos et al., 2005). Em *T. infestans*, o voo é promovido quando os insetos são expostos a um baixo estado nutricional ou a altas temperaturas (Lehane

& Schofield, 1982; Lehane et al., 1992; Ceballos et al., 2005). Em estudos de laboratório, os mesmos fatores parecem afetar a frequência de início de voo de *R. prolixus* (Figura 5) e *Triatoma sordida* (Gringorten & Friend, 1979; McEwen & Lehane, 1993). Ainda, foi observado em estudos de campo que os exemplares de *T. sordida* capturados em armadilhas luminosas normalmente apresentavam um baixo estado nutricional (Wisnivesky-Colli et al., 1993; Noireau & Dujardin, 2001).

A capacidade de voo de *T. infestans* no campo tem sido bastante discutida. Alguns estudos realizados relatam voos curtos de entre 110 e 500m (Lehane & Schofield, 1982). Adicionalmente, Schweigmann et al. (1988) sugeriram que a dispersão desta espécie através do voo poderia alcançar uma distância máxima de 1,5 a 2 km baseados em resultados obtidos com armadilhas luminosas.

Minoli & Lazzari (2006) verificaram que *T. infestans* e *R. prolixus* exibem uma forte atração frente a luz branca durante o voo. Além disso, Vazquez-Prokopec et al. (2004) tiveram sucesso coletando *T. infestans* mediante armadilhas de luz branca em áreas rurais da Argentina. A captura de várias espécies de triatomíneos com a ajuda de armadilhas de luz tem sido repetidamente relatada em áreas endêmicas (Tonn et al., 1978; Schweigmann et al. 1988; Noireau et al. 2000; Noireau & Dujardin, 2001; Vazquez-Prokopec et al. 2004; Carbajal de la Fuente et al., 2007). Cabe concluir que os triatomíneos adultos parecem apresentar uma clara tendência a se dispersar mediante o voo. Resta ainda avaliar se esta atividade está somente relacionada à busca de hospedeiros ou se pode também fazer parte de um mecanismo reprodutivo.



Figura 5- Início de vôo em um macho de *Rhodnius prolixus*.

Foto: Rodrigo Sinistro

# Objetivos

---

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar o comportamento sexual e os principais mecanismos que o medeiam em *R. prolixus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Descrever para cada sexo o padrão temporal de saída e entrada de abrigos, e de locomoção fora dos mesmos, na ausência de sinais de sexo oposto;
- Avaliar se há sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto capazes de ativar a saída de abrigos e de alterar a atividade locomotora dos insetos;
- Analisar a frequência de início de voo e avaliar se há orientação do início do voo de machos e fêmeas na ausência de sinais de conespecíficos.
- Analisar se há aumento na frequência de início de voo (ativação) e indução de orientação do início do voo de machos e fêmeas na presença de sinais de conespecíficos.
- Verificar a origem dos sinais químicos mediadores do início do vôo de adultos de *R. prolixus*.
- Analisar se machos e fêmeas desta espécie apresentam orientação frente a correntes de ar limpo durante a locomoção.
- Analisar se machos e fêmeas desta espécie mostram orientação durante a locomoção frente a correntes de ar limpo transportando odores de conespecíficos.
- Verificar a origem dos sinais químicos mediadores da orientação de adultos de *R. prolixus*.
- Confirmar a ocorrência da agregação de machos em volta de casais em cópula;

- Analisar se os odores produzidos pelas glândulas metasternais de fêmeas e machos são necessários para promover o comportamento de agregação de machos de *R. prolixus*;



# Materials e Métodos

---

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Dinâmica de uso de abrigos em adultos de *Rhodnius prolixus*: a atividade locomotora modulada por sinais sexuais**

No presente trabalho caracterizamos o padrão de atividade de saída e entrada de abrigos de adultos de *R. prolixus*, assim como a sua atividade locomotora espontânea. Adicionalmente, avaliamos se a presença de sinais químicos emitidos por conespecíficos do sexo oposto é capaz de ativar a saída dos insetos dos seus abrigos e afetar o nível de atividade locomotora apresentado pelos mesmos.

##### **3.1.1 Insetos**

Nos experimentos foram utilizados adultos de *R. prolixus*, obtidos de uma colônia procedente de Honduras. Os insetos foram mantidos no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou sob condições controladas ( $27 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10$  %). A alimentação da colônia foi realizada em semanalmente galinhas (*Gallus gallus*). Entretanto, os insetos utilizados nos ensaios foram sexados como ninfas de 5º estágio (Espínola, 1966) e mantidos virgens até sua utilização como adultos com 30 dias de idade e 15 dias de jejum. Os insetos foram expostos a um ciclo de luz de 12:12 L/E por pelo menos três dias antes de realizar os ensaios e após a sua utilização foram descartados.

Foram realizadas as seguintes séries experimentais:

1) Avaliação da atividade espontânea de machos.

2) Avaliação da atividade espontânea de fêmeas.

3) Avaliação da atividade de machos na presença de odor de fêmeas (10 fêmeas adultas).

4) Avaliação da atividade espontânea de fêmeas na presença de odor de machos (10 machos adultos).

### **3.1.2 Desenho experimental**

O desenho experimental utilizado neste estudo segue um modelo semelhante ao apresentado por Lorenzo & Lazzari (1998). Brevemente, nos ensaios foi utilizada uma arena experimental de vidro de 0,4 x 0,4 m com papel de filtro cobrindo o substrato (Figura 6). No centro da arena, um pedaço de papelão corrugado de 8 x 6 cm foi oferecida aos insetos como esconderijo. Todos os ensaios foram realizados em uma sala que apresentava um ciclo de iluminação de 12:12 L/E controlado por um temporizador. Em cada uma das séries experimentais desenvolvidas foram realizadas 6 ensaios.

Como fonte de estímulos olfativos foram utilizados 10 adultos de sexo oposto ao do grupo cuja atividade estava sendo avaliada. Os adultos utilizados como fonte de estímulo foram padronizados e submetidos às mesmas condições de temperatura, umidade e ciclo de luz que os do grupo testado. O grupo de 10 insetos era colocado dentro de um frasco de plástico de 9,5 x 6,5 cm, aqui denominado dispositivo de apresentação de estímulos, que apresentava uma abertura fechada com uma tela de arame para evitar a saída dos insetos, porém permitindo a passagem de odores. Este dispositivo era suspenso a 15 cm de altura acima do centro do abrigo mediante uma linha de náilon amarrada em um suporte. Desta forma, a abertura do recipiente ficava sempre voltada para baixo (Figura 6). Esta separação entre o dispositivo de apresentação de estímulos e a arena impedia o contato físico, evitando assim, a transmissão de vibrações ao substrato acima do qual era desenvolvido o experimento. Desta forma, quaisquer odores emitidos pelos insetos presentes no dispositivo podiam sinalizar sua presença para o grupo de insetos cuja atividade estava sendo testada.

Para cada ensaio, um grupo de 20 insetos foi inicialmente introduzido no interior da arena, evitando perturbá-los. Este procedimento foi realizado três dias antes do início dos ensaios para permitir a aclimação dos insetos no ambiente e garantir que estivessem sincronizados com o regime de iluminação desejado. No final deste período, normalmente 100% dos insetos haviam entrado no abrigo. Na primeira noite após o intervalo de aclimação, a atividade dos insetos era registrada mediante o uso de uma câmera de vídeo tipo CCD (HDL) e um gravador do tipo time-lapse (Samsung SRV-960N Brasil). Foi utilizado um painel de LEDs emissores de radiação infravermelha (IR, comprimento de onda de 900 nm), cuja luz não é percebida pelos insetos (Reisenman et al., 2002), a fim de permitir a filmagem em vídeo. Nestes ensaios o dispositivo de apresentação de odores era apresentado vazio como controle. Os ensaios da primeira noite tinham o objetivo de descrever o nível de atividade espontânea dos insetos de cada sexo. Na noite seguinte, 10 adultos do sexo oposto foram apresentados dentro do dispositivo, a partir de um minuto antes do início da escotofase e a atividade dos insetos foi registrada novamente.

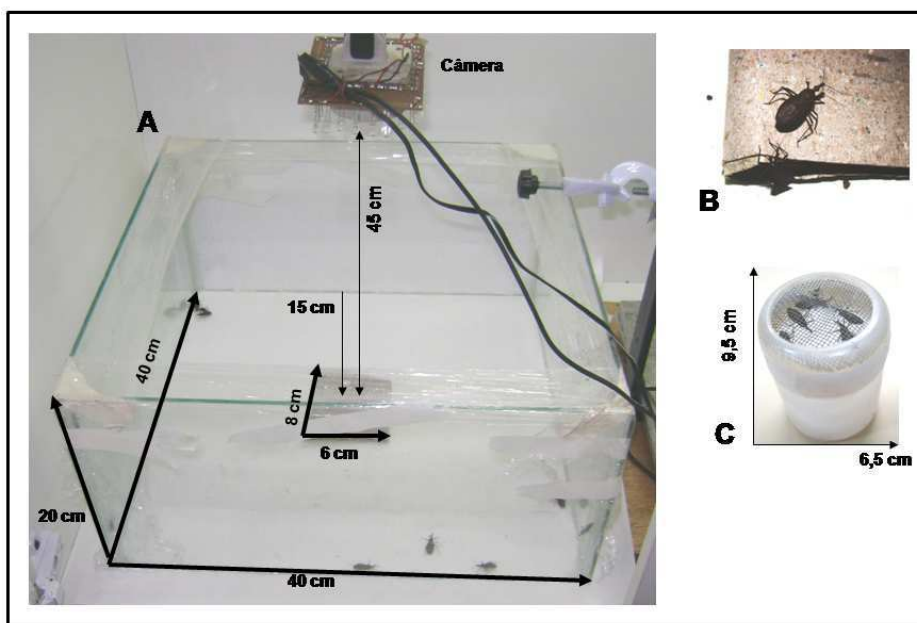


Figura 6- Desenho experimental utilizado para o estudo da atividade locomotora de triatomíneos em abrigos artificiais. (A) Arena experimental (40 x 40 x 20 cm). (B) Abrigo artificial (8 x 6 cm), (C) Detalhe do dispositivo de apresentação do estímulo (9,5 x 6,5 cm), normalmente suspenso por um fio de náilon a 15 cm do centro do abrigo, destacando a abertura fechada com tela de arame que ficava voltada para o abrigo. (Adaptado de Lorenzo & Lazzari, 1998).

### 3.1.3 Registro e análise do comportamento

O registro da atividade dos insetos começava ao final do terceiro dia, duas horas antes da luz ser apagada e prosseguia durante 12 horas consecutivas da escotofase, finalizando duas horas após o início da fotofase. Desta forma foram amostrados 1,6 quadros por segundo, totalizando 16 horas por ensaio.

A imagem representada no monitor de televisão mostrava o abrigo e suas adjacências, de maneira que o registro da atividade dos insetos era feito para toda a área da arena (Figura 7). Para verificar se existia um efeito da presença de odores de

insetos conespecíficos do sexo oposto na atividade de saída e entrada ao abrigo e na atividade locomotora, os seguintes parâmetros foram registrados:

- a) número de total de insetos fora do abrigo por hora;
- b) atividade locomotora;
- c) tentativas de cópula entre machos

A atividade locomotora foi mensurada traçando sobre a imagem do monitor de TV um par de eixos ortogonais centralizados na tela e quantificando cada vez que um indivíduo cruzava qualquer uma das linhas da tela (Figura 9). Aqueles eventos em que um indivíduo colocava o corpo inteiro fora do esconderijo foram considerados como saídas do abrigo.

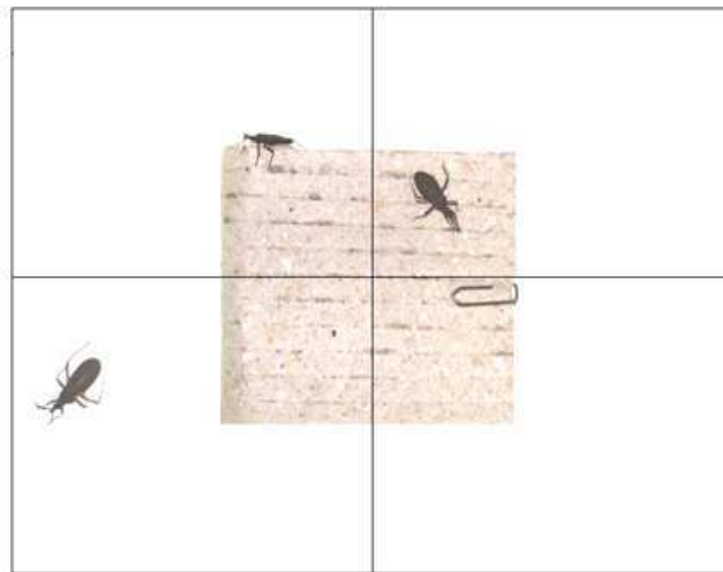


Figura 7- Desenho e foto ilustrativos mostrando o abrigo e o par de eixos ortogonais desenhados na tela do monitor do aparelho de televisão utilizados para quantificar a atividade dos insetos.

### 3.1.4 Análise estatística

Para análise da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. A comparação do número total de saídas espontâneas do abrigo com o número de saídas de insetos na presença do odor de conespecíficos do sexo oposto foi realizada mediante o teste  $t$  de Student para amostras pareadas, utilizando um limite discriminante menor que 0,05. O teste  $t$  de Student para amostras independentes foi utilizado na comparação das variáveis entre os sexos.

A fim de avaliar a influência de potenciais sinais de conespecíficos do sexo oposto na atividade dos insetos, foram comparados os dados obtidos em ambas as condições. Primeiramente, fez-se uma proporção da atividade locomotora um determinado ensaio pelo número de insetos que deixaram o abrigo naquele ensaio. Desta maneira, dividiu-se a atividade registrada por hora pelo número de insetos fora do abrigo naquele mesmo período, como método para comparar o nível de atividade apresentado de maneira mais independente do número de insetos ativos. O teste  $t$  de Student para amostras pareadas foi empregado na comparação destes valores.

### **3.2 Ativação e orientação durante o início do voo de *Rhodnius prolixus* frente a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto**

O presente experimento foi planejado para descrever o padrão basal de frequência de início de vôo na presença de correntes de ar limpo em machos e fêmeas de *R. prolixus*. Em uma fase subsequente, foi analisado se a atividade de voo de machos e fêmeas pode ser ativada pela associação de odores emitidos por indivíduos do sexo oposto nas condições previamente descritas. Além disso, analisamos se esta atividade apresenta uma orientação significativa na presença de correntes de ar associadas a odores emitidos por indivíduos do sexo oposto. Finalmente, após determinar a existência de odores emitidos por fêmeas que medeiam a ativação do início do voo de machos, caracterizamos a sua origem glandular.

#### **3.2.1 Insetos**

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram obtidos de uma colônia do Serviço Nacional de Chagas (Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina) e mantidos no insetário do Laboratório de Fisiología de Insectos da Universidade de Buenos Aires, Argentina. Os insetos foram mantidos sob um ciclo de iluminação 12:12 L/E, a  $28 \pm 2$  °C e  $60 \pm 10$  % de umidade relativa, e alimentados semanalmente com galinhas (*Gallus gallus*). Em cada ensaio foi avaliado o comportamento de um grupo de 20 adultos virgens de um dos sexos, com 30 dias após a muda imaginal e 15-20 dias de jejum.

#### **3.2.2 Séries experimentais**

Foram realizadas as seguintes séries experimentais (4 ensaios/série):

- 1) machos confrontados a correntes de ar limpo (controle);
- 2) fêmeas confrontadas a correntes de ar limpo (controle);



- 3) machos confrontados a correntes de ar associadas a odor de macho;
- 4) fêmeas confrontadas a correntes de ar associadas a odor de macho;
- 5) machos confrontados a correntes de ar associadas a odor de fêmea;
- 6) fêmeas confrontadas a correntes de ar associadas a odor de fêmea;
- 7) machos confrontados a correntes de ar associadas a odor de 10 fêmeas que tiveram os orifícios das GMs ocluídos com parafina (ver figura 8);
- 8) machos confrontados a correntes de ar associadas a odor de 10 fêmeas que tiveram os orifícios das GBs ocluídos com parafina;
- 9) machos confrontados a correntes de ar associadas a odor de 10 fêmeas manipuladas de maneira semelhante à utilizada para ocluir as glândulas, mas sem evitar a liberação de odores;
- 10) machos confrontados a correntes de ar associadas aos odores emitidos por uma amostra de 10 GMs dissecadas de fêmea (*pool* de glândulas);
- 11) machos confrontados a correntes de ar associadas a odores de uma amostra de cutícula e tecidos internos de fêmea.

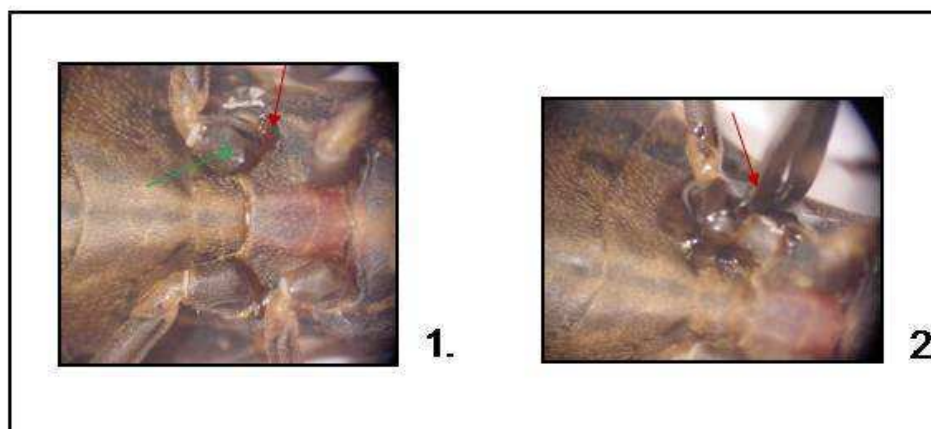


Figura 8- Oclusão da glândula metasternal. 1. Localização do orifício de saída de uma glândula metasternal (seta vermelha) junto à coxa das patas traseiras (seta verde). 2. Momento da oclusão com a parafina, destacando a extremidade do microcauterizador (seta vermelha).

### 3.2.3 Dispositivo experimental

Os ensaios foram realizados em uma gaiola de voo (2 x 2 x 2 m) feita de tecido semitransparente (Figura 9). Os insetos foram liberados em uma arena experimental suspensa 1 m acima do substrato da gaiola e centralizada na mesma (Figura 10). As fontes de estímulos (grupos de 10 machos ou fêmeas trocados a cada ensaio) eram colocados em um frasco cilíndrico cuja base e boca foram fechadas com tela para permitir a passagem de ar e de potenciais substâncias voláteis emitidas pelos insetos. O recipiente contendo os insetos era colocado dentro do sistema de geração da corrente de ar para que os odores fossem arrastados pela mesma. A corrente chegava ao topo da plataforma de voo com uma velocidade de 12cm/s. Quando o estímulo oferecido foi um preparado de glândulas ou cutícula, estes foram apresentados em um frasco de 2ml colocado posteriormente dentro do dispositivo de

geração da corrente de ar. Uma câmera de vídeo registrava a direção do início dos voos em relação à fonte de estímulo durante 8 horas que se iniciavam junto com a escotofase.

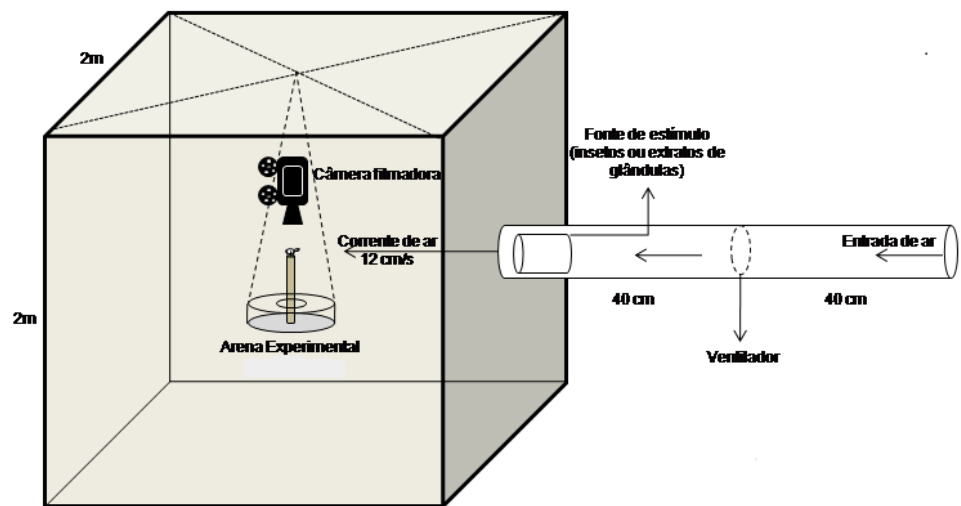


Figura 9- Esquema do desenho experimental utilizado para estudar o início do voo de *Rhodnius prolixus*. (Adaptado de Minoli & Lazzari, 2006).

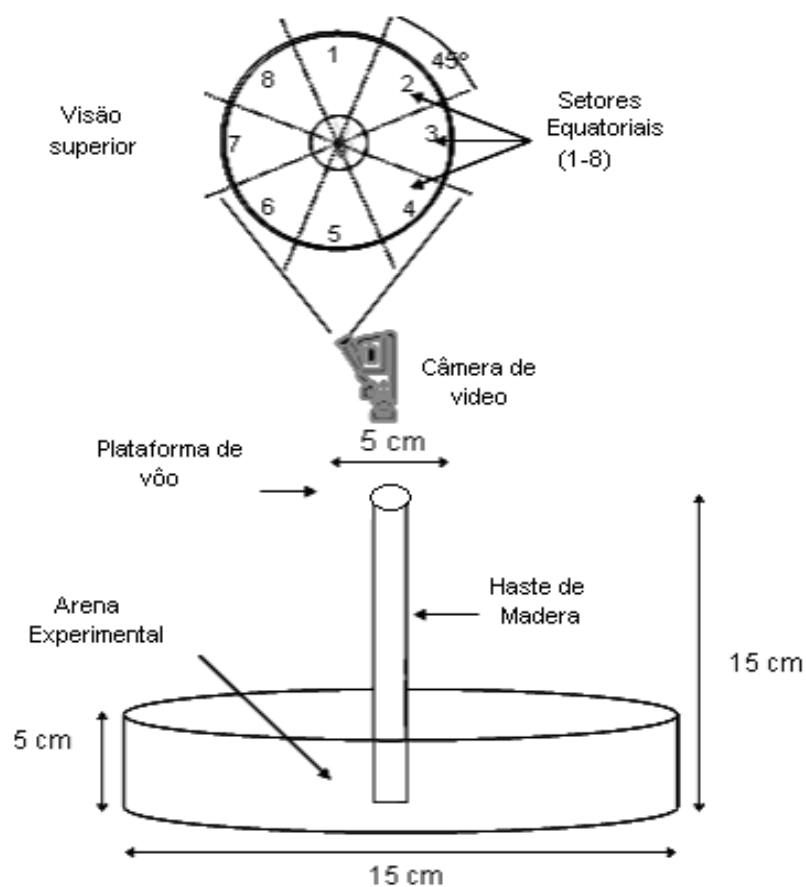


Figura 10- Esquema da arena experimental onde os insetos foram liberados dentro da gaiola de vôo. Os insetos eram liberados dentro da arena e somente podiam deixá-la subindo a haste de madeira e iniciando o voo (Adaptado de Minoli & Lazzari, 2006).

### 3.2.4 Análise estatística

Em cada ensaio foi quantificado: (a) o número total de insetos que iniciaram o voo, i.e., a sua ativação (b) a direção do início de voo de cada inseto, i.e., sua orientação. As diferenças na freqüência do voo foram analisadas utilizando o teste de ANOVA  $p \leq 0,05$ .

Para a análise das fitas foram definidos oito setores de  $45^\circ$  que variavam entre  $0^\circ$  a  $360^\circ$  a fim de determinar se havia uma direção predominante nos inícios de voo (Figura 10). A direção escolhida durante o início do voo foi analisada utilizando estatística circular. O comprimento do vetor resultante ( $r$ ) e o ângulo médio ( $\mu$ ) definidos pela análise dos vôos registrados em cada série foram calculados a partir do ângulo médio ( $\alpha\mu$ ) do número total de ensaios. O ângulo médio de início de vôo podia variar entre  $0^\circ$  e  $360^\circ$ , enquanto o comprimento do vetor  $r$  podia variar entre 0 e 1, sendo que 0 indicaria uma direção média não definida e 1 indicaria um início de voo em uma direção única em todos os indivíduos. A direção do estímulo, i.e., a corrente de ar limpo ou associado com odor, foi designada arbitrariamente em  $0^\circ$  (setor 1, figura 10). A evidência estatística de uma distribuição uniforme em torno de um círculo foi analisada através do teste de Rayleigh, sendo que a nossa  $H_0$  indicava que os dados eram distribuídos uniformemente, i.e., não havia direção preferida (Zar, 1984). Caso fosse rejeitada a  $H_0$ , o teste  $V$  era realizado para avaliar se o  $\alpha\mu$  calculado para a amostra era estatisticamente diferente da direção da corrente de ar ( $H_a: \alpha\mu$  é distante de  $0^\circ$ ) (Zar, 1984).

### **3.3 Orientação modulada por odor durante a locomoção de adultos de *Rhodnius prolixus***

Este estudo foi dedicado a testar se adultos de *R. prolixus* respondem com orientação anemotática modulada por odor durante a sua locomoção quando confrontados com correntes de ar associadas a odores emitidos por outros adultos. Para isso, registramos as respostas de locomoção de indivíduos adultos na presença de sinais químicos emitidos por adultos conespecíficos utilizando um compensador de marcha. Procuramos também determinar a identidade da fonte dos compostos que promoveram a orientação neste contexto.

#### **3.3.1 Insetos**

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram obtidos de uma colônia procedente de Honduras. Os insetos eram mantidos no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou sob condições controladas de  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10$  %. A colônia foi alimentada semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*). Os insetos utilizados nos ensaios foram adultos virgens, com 20 dias de idade após a muda imaginal, 10 dias de jejum e expostos a um ciclo de iluminação de 12:12 L/E. Em cada ensaio, um indivíduo era utilizado e subsequentemente descartado.

#### **3.3.2 Registro das trajetórias**

Um compensador de marcha construído *ad hoc* foi utilizado para analisar a orientação dos insetos (adaptado de Dahmen, 1980). Este sistema consistiu de uma esfera de isopor de 9,7 cm de diâmetro e 2,5 g de peso, suspensa por uma corrente de ar projetada verticalmente de baixo para cima (Figura 11). Um inseto era fixado pelo dorso a uma haste de metal centrada no ápice da esfera de isopor com a ajuda de um pedaço de fita dupla face. O extremo da haste em contato com o corpo do inseto permitia que este realizasse uma livre rotação de 360°. Os insetos, já fixados

na haste, eram colocados em contato com a esfera, de maneira que suas patas tocavam a superfície do isopor. Cabe salientar que o experimentador controlava que os insetos ficassem numa postura que lhes permitisse caminhar normalmente. Quando os tarsos dos triatomíneos contactavam a superfície da esfera, estes iniciavam a marcha espontaneamente, deslocando a esfera debaixo de suas patas. Desta forma, cada inseto podia caminhar e girar livremente, mudando sua direção sem mudar sua distância em relação às fontes das correntes de ar (Figura 11). Um desenho experimental idêntico foi utilizado por Barrozo et al., (2003) para estudar a orientação de ninfas de *Triatoma infestans* frente a odor de hospedeiro.

O compensador de marcha é formado pelo sensor óptico de um *mouse* de computador localizado tangencialmente a 1 mm de distância da esfera, em um pólo inferior a posição do inseto. O movimento da esfera induzido pelo triatomíneo é detectado pelo sensor óptico que transmite esta informação a intervalos programáveis ao processador (no presente caso a cada 0,3 segundos). Com a ajuda de um software chamado *Getmouse*, e que foi desenvolvido *ad hoc* (Diego Anfossi), a exata posição do inseto pode ser convertida em coordenadas  $x$  e  $y$ . Desta forma, os dados foram obtidos individualmente durante 15 minutos para cada inseto a intervalos de 0,3 segundos.

A trajetória de cada inseto pôde ser visualizada a partir da representação direta de  $y$  em função de  $x$ . Neste caso, cada segmento era composto por um módulo de cinco dados (ou 1,5 segundos) atuando como um filtro que elimina variações rápidas de direção que não são relevantes, por exemplo, movimentos de rotação do corpo alternados associados ao deslocamento das patas. É importante ressaltar que quando um inseto para de se locomover, as coordenadas  $x$  e  $y$  não mudam. Uma vez obtidos os dados de direção de deslocamento de cada inseto,

estes eram exportados para o programa ORIANA 2.0 para a sua representação e análise mediante estatística circular.

### **3.3.3 Orientação e fontes de odor**

O sistema de estimulação consistiu de uma corrente de ar principal, gerada por uma bomba que impelia o ar do ambiente. A corrente principal foi dividida em duas correntes de fluxo idêntico e contínuo e que eram apresentadas em direções opostas. Cada corrente passava através de um recipiente de vidro (125 ml) onde podiam ser colocados os estímulos a testar. As conexões entre recipientes foram feitas utilizando mangueiras de silicone de 0,4 cm de diâmetro interno. No final de cada mangueira foi conectado um tubo de vidro de 0,67 cm diâmetro interno e 5 cm de comprimento para direcionar cada corrente de ar (Figura 11). As duas correntes de ar foram posicionadas tangencialmente à superfície do ápice da esfera de isopor e em direções opostas. Assim, as correntes de ar conduziam os odores até a posição onde estava localizado o inseto (Figura 11). Um dos frascos de vidro sempre se apresentava vazio (controle) e o outro frasco continha a fonte de odor a ser testada. A saída de cada corrente de ar estava localizada a 5 cm da posição do inseto (Figura 10). As correntes de ar foram apresentadas com uma velocidade de 8 cm/s, mensurada na posição exata onde se encontrava o inseto acima da esfera. Tal fluxo foi medido com a ajuda de um anemômetro (Testo 405-V1, Alemanha).

As correntes de ar foram ligadas três minutos antes do posicionamento do inseto na esfera. Uma vez posicionado o inseto sobre o compensador de marcha, era necessário aguardar 3 minutos para que este se aclimatasse à nova situação experimental. Logo após este período, se iniciava o registro do comportamento do inseto. Os insetos (n=30 por serie) foram testados individualmente nas seguintes condições experimentais:



1. Machos frente a duas correntes de ar limpo (controle);
2. Machos frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de macho;
3. Machos frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de fêmea;
4. Fêmeas frente a duas correntes de ar limpo (controle);
5. Fêmeas frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de macho;
6. Fêmeas frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de fêmea;
7. Fêmeas frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de camundongo;
8. Machos frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de fêmeas com os orifícios das GMs (ver figura 6).
9. Machos frente a uma corrente de ar limpo vs uma corrente de ar associada a odor de fêmeas com parafina colocada em um local específico da cutícula sem ocluir os orifícios das GMs.

Todos os ensaios foram realizados numa sala escura com temperatura  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade de  $60 \pm 10$ . Após quatro ensaios, as fontes de estímulos eram trocadas por novas, assim como os lados teste e controle. Cada inseto era utilizado uma única vez e depois descartado.

Odor de camundongo foi testado com fêmeas, a fim de permitir desenvolver uma série com função de controle positivo para as fêmeas.

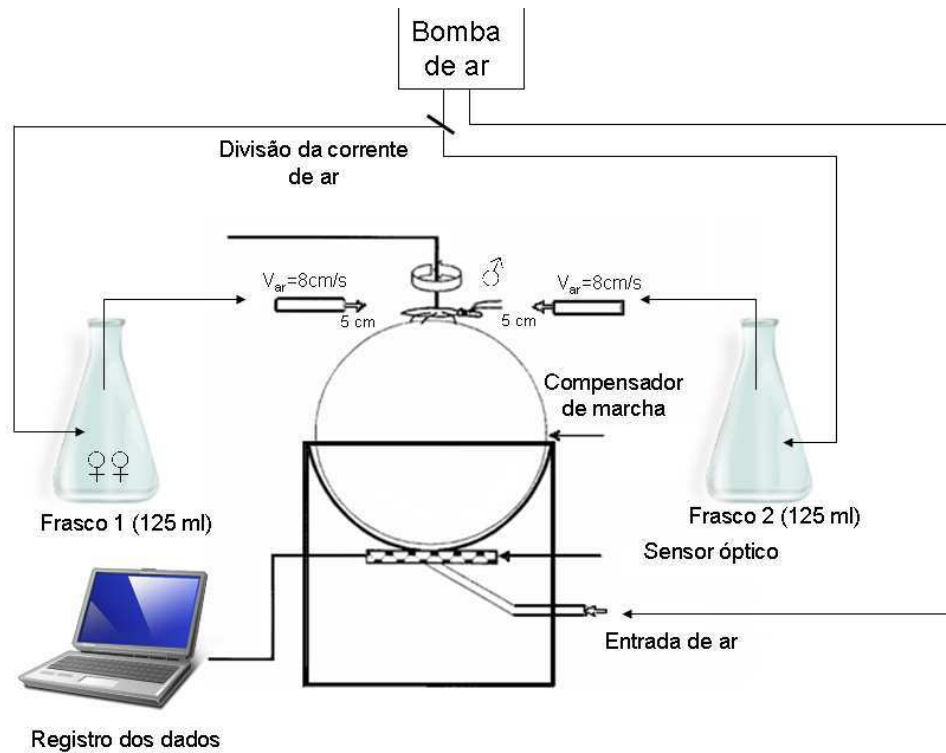


Figura 11- Desenho experimental utilizado para o registro das trajetórias de adultos de *R. prolixus* frente a correntes de ar associadas a odores de conespecificos (adaptado de Barrozo et al, 2003).

### 3.3.4 Análise dos dados

Foi utilizada estatística circular (Zar, 1984) para avaliar a direção dos insetos em todas as séries experimentais realizadas. O ângulo médio ( $\mu$ ) da trajetória realizada por cada inseto foi computado e subsequentemente, um ângulo médio da trajetória de cada grupo ( $\alpha\mu$ ) e o comprimento do vetor resultante ( $r$ ) foi calculado. Sendo que  $\alpha\mu$  podia variar entre 0 e 360° e  $r$  entre 0 e 1 (0: direção média indefinida. 1: direcionalidade em relação à fonte de estímulo). A posição da corrente-estímulo foi designada como 0° e a da corrente-controle 180°. A evidência estatística de direcionamento foi testada através do teste Rayleigh (Zar, 1984), sendo que a  $H_0$  é que a população amostrada é uniformemente distribuída, enquanto a  $H_a$  indica que a população não segue uma distribuição uniformemente circular e, portanto há uma resposta direcional. Quando os dados não foram significativamente uniformes, i.e. quando o teste de Rayleigh indicava que  $p < 0,05$ , um segundo teste, o teste V (Zar, 1984) foi realizado para calcular se o ângulo médio registrado era estatisticamente diferente da direção da fonte de estímulo (0°).

Adicionalmente, e para facilitar a visualização dos dados, um índice de orientação (IO) foi calculado multiplicando o coseno do ângulo médio ( $\alpha\mu$ ) pelo comprimento do vetor resultante ( $r$ ):

$$\text{IO} = \cos(\alpha\mu) * r$$

O IO varia entre -1 e 1 (-1 indicando orientação contra e 1 orientação junto a corrente de ar associada à fonte de odor). A fim de comparar os índices de orientação das fêmeas foi realizado um teste de ANOVA de um fator seguido por uma comparação de pares de médias pelo teste de Tukey. Para o grupo dos

machos foi utilizada uma análise de Kruskal-Wallis. A trajetória de cada inseto pôde ser visualizada a partir da representação direta de  $y$  em função de  $x$ .

### 3.4 Agregação sexual em *Rhodnius prolixus*

O comportamento de agregação associado a cópula foi investigado em ensaios realizados com a espécie *R. prolixus*. A distribuição espacial em ambos os sexos foi observada na presença e na ausência de um par em cópula como fonte do estímulo disparador.

#### 3.4.1 Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram obtidos de uma colônia de *R. prolixus* procedente de Honduras e mantida no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou. Os insetos foram criados sob condições controladas de temperatura ( $27 \pm 2$  °C) e umidade relativa ( $60 \pm 10$  %). A alimentação da colônia foi realizada semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*). Foram utilizados insetos adultos virgens, com 20 dias após a muda imaginal e 10 dias de jejum. Em cada ensaio foi utilizado um grupo de 5 insetos que posteriormente foram descartados. Todos os insetos utilizados nos ensaios foram expostos a um ciclo de iluminação de 12:12 L/E por pelo menos três dias antes de cada ensaio.

A dinâmica de agregação foi avaliada através da análise do comportamento de grupos de *R. prolixus* adultos nas seguintes séries experimentais:

- 1) ensaios com 4 machos e 1 fêmea.
- 2) ensaios com 4 fêmeas e 1 macho.
- 3) ensaios com 4 machos e 1 macho marcado.
- 4) ensaios com 4 machos e 1 fêmea com os orifícios da GMs ocluídos com parafina.
- 5) ensaios com 4 machos e 1 fêmea tratada com parafina, mas sem ocluir os orifícios das GMs (controle *sham*).

6) ensaios com 4 machos com os orifícios das GMs ocluídos com parafina e 1 fêmea.

### **3.4.2 Desenho experimental**

Em cada ensaio, 4 insetos foram liberados no centro da arena circular (25 cm diâmetro X 10 cm altura) cujo fundo foi forrado com papel de filtro como substrato para locomoção. Depois de 15 minutos, uma fêmea ou um macho (marcado no tórax com um ponto de Liquid-paper®) era liberado. A fim de evitar uma possível perturbação mecânica, cada indivíduo era manipulado com o auxílio de um pedaço de papel no qual era cuidadosamente induzido a subir. Subsequentemente, o inseto era transferido para a arena. O tempo de observação em todos os ensaios nunca excedeu 90 minutos, mesmo naqueles ensaios em que houve mais de uma cópula. O comportamento dos insetos foi registrado através de uma câmera de vídeo localizada acima da arena experimental. A oclusão das glândulas metasternais foi realizada como descrito em seções anteriores (ver figura 6).

Todos os ensaios foram realizados no início da escotofase, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade de  $60 \pm 10$ .

### **3.4.3 Análise dos dados**

A arena experimental circular apresentava uma área de  $490 \text{ cm}^2$ . Para quantificar o processo de agregação foi definido um círculo de 5 cm de diâmetro e  $20 \text{ cm}^2$  de área como critério arbitrário de medida (correspondendo a 3% da área da arena experimental). Este círculo, cujo centro era o pronoto da fêmea ou do macho marcado, foi utilizado como medida de agregação, ou seja, qualquer inseto dentro desta região da arena era considerado agregado. Outros parâmetros quantificados foram: a) frequência da cópula, b) duração média da cópula, c) duração média da guarda da fêmea pelo macho na fase pós-cópula e, d) ocorrência de uma segunda cópula. A análise das fitas foi feita com a ajuda de um monitor de televisão. O

número de insetos detectados dentro do círculo era verificado a cada cinco minutos após o início da cópula e até que esta finalizasse. Adicionalmente, também foi monitorado o número de insetos dentro do círculo um minuto antes da cópula e no momento exato em que iniciava a cópula. É importante ressaltar que todas as cópulas foram analisadas até o seu fim. Entretanto, e a fim de homogeneizar os dados, (devido ao fato de que o tempo de finalização das cópulas foi diferente) definimos um ponto de corte aos 40 minutos. Para quantificação da agregação, o centro do círculo de agregação era sobreposto ao pronoto da fêmea (ou do inseto marcado) e todo inseto que se encontrasse com mais da metade do corpo dentro do círculo era contabilizado (Figura 12).



Figura 12- Foto mostrando o círculo de quantificação da agregação sobreposto, apresentando uma fêmea no centro do círculo e um grupo de machos ao redor do casal em cópula.

Para verificar a existência da agregação nos grupos estudados, foi realizada uma tabela de frequência 2x2, seguida de um teste de Qui-quadrado. As categorias analisadas foram agrupadas, desta forma umas das variáveis comparadas foi ocorrência da agregação (4M1F, 4M1Fsham, 4Mmt1F) vs não agregação (4M1M, 4M1Fmt, 4F1M). A segunda variável separou o número de insetos agrupados (0-1, > 1). Para a comparação da frequência de cópula entre as diferentes séries experimentais foi utilizado o teste Qui-quadrado de partição. Para a análise da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Na comparação da duração da cópula foi utilizado um teste de ANOVA de um fator. Adicionalmente, na análise da duração da associação pós-cópula utilizamos um teste de Kruskal-Wallis. Em todos os testes foi utilizado um limite discriminante menor que 0,05.



**Resultados**

---

## 4 Resultados

### 4.1 Dinâmica de uso de abrigos em adultos de *Rhodnius prolixus*: a atividade locomotora modulada por sinais sexuais

A dinâmica de saída do abrigo de machos e fêmeas em ambas as condições foi comparada. A figura 13 representa a variação temporal do número médio de machos fora do abrigo ao longo do tempo. Na ausência de odor de fêmeas, um baixo número de machos abandonou os abrigos, sem variações aparentes ao longo do tempo. Entretanto, na presença de odor de fêmeas observou-se um aumento drástico no número médio de machos fora do abrigo. A comparação do número médio de machos fora do abrigo nas séries controle e experimental foi significativamente diferente (teste *t de Student para amostras pareadas*,  $p < 0,01$ ). Na figura 14 é possível observar que as fêmeas saíram dos abrigos com alta frequência nas duas séries estudadas, demonstrando que a atividade de saída do abrigo das fêmeas não foi afetada pela presença de odor de macho. A comparação do número médio de fêmeas fora do abrigo nas séries controle e experimental não apresenta diferença estatística (teste *t de Student para amostras pareadas*, N.S.). Cabe salientar que esse padrão de saída do abrigo das fêmeas foi maior no início da escotofase, mas foi observado ao longo da maior parte do experimento. Foi possível observar uma tendência das fêmeas deixarem os abrigos nas primeiras horas da escotofase e retornarem somente no final desta fase. Entretanto, quando foi comparada a atividade espontânea de saída de abrigos de ambos os sexos (somente as séries controle), as fêmeas apresentaram atividade significativamente maior do que os machos (teste *t de Student para amostras independentes*,  $p < 0,002$ ).

Uma comparação foi realizada para avaliar se existia diferença na atividade locomotora espontânea de machos e fêmeas de *R. prolixus*, porém nenhuma diferença significativa foi observada (teste *t* de Student para amostras independentes, N.S.).

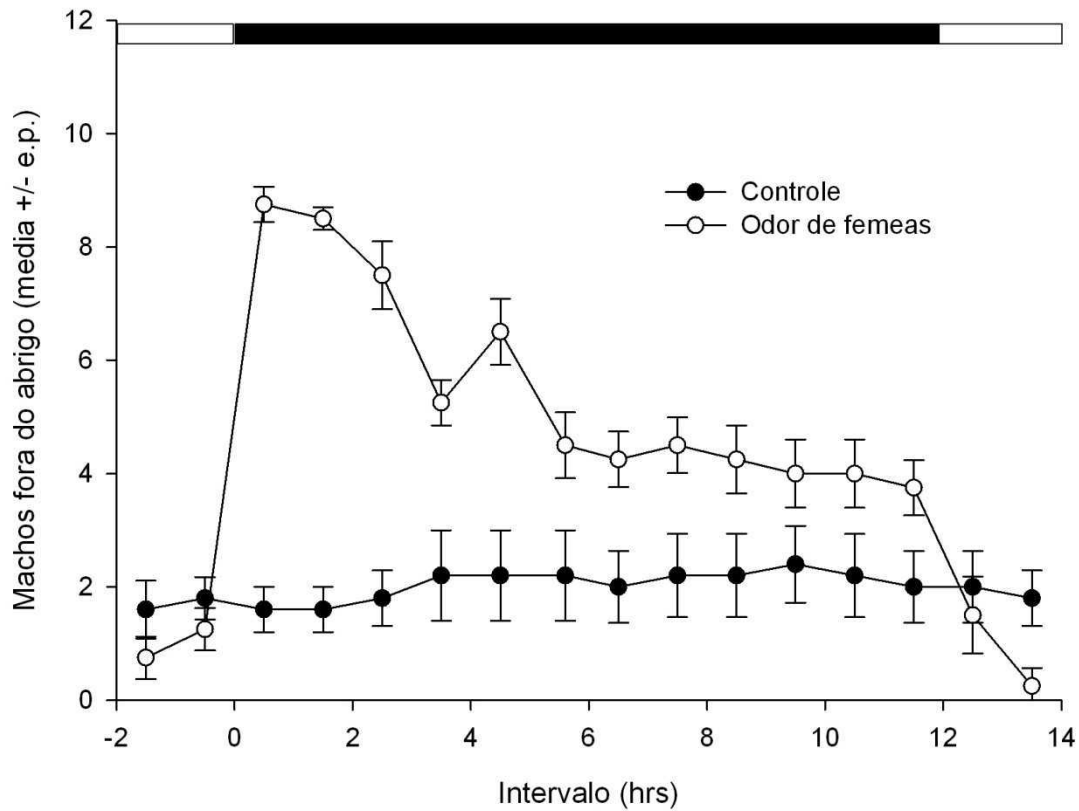


Figura 13- Variação do número médio de machos fora do abrigo ao longo do tempo. (●) Atividade espontânea; (○) Atividade de machos na presença de odor de fêmeas. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase.

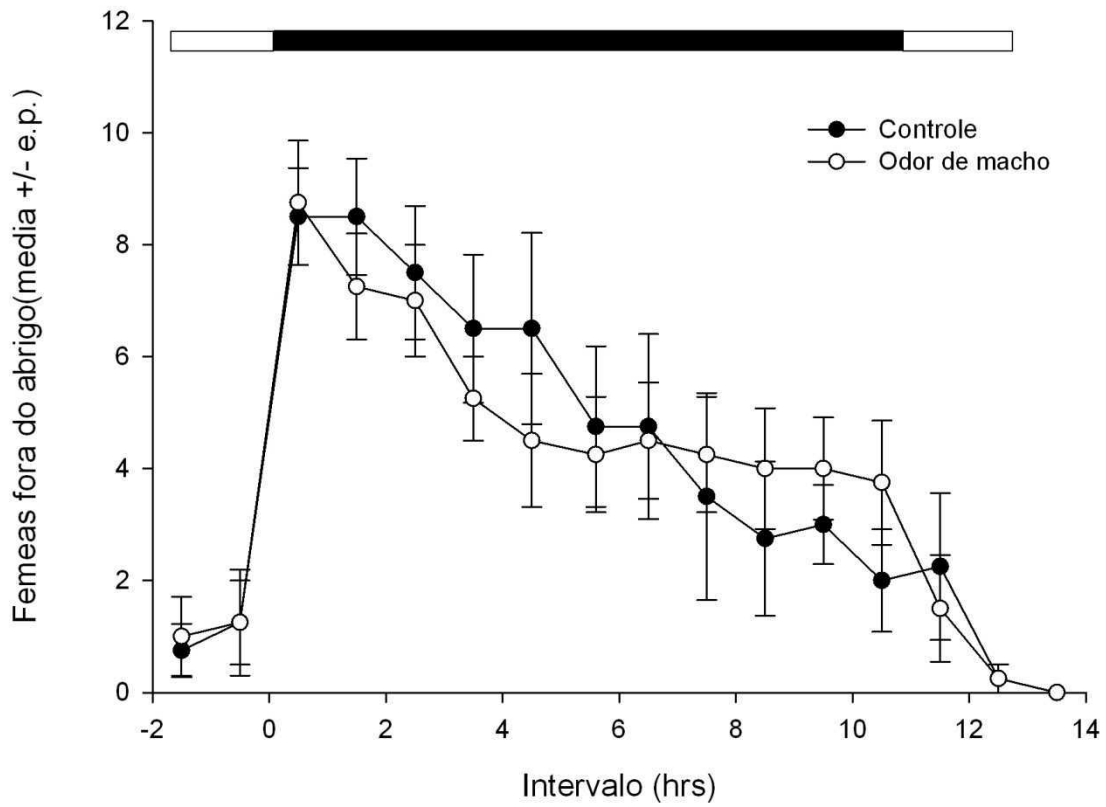


Figura 14- Variação do número médios de fêmeas fora do abrigo ao longo do tempo. (●) Atividade espontânea. (○) Atividade de fêmeas na presença de odor de machos. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase.

A atividade locomotora dos machos foi sensivelmente aumentada na presença de odor de fêmeas (Figura 15; teste *t de Student para amostras pareadas*,  $p < 0,02$ ). Entretanto, quando fêmeas foram estimuladas com odor de machos não foram observadas mudanças na sua atividade locomotora (Figura 16; teste *t de Student para amostras pareadas* N.S.).

Os resultados relacionados à variação temporal demonstram que durante as primeiras horas da escotofase, machos de *R. prolixus* aumentam sua atividade locomotora na presença de odores de fêmeas (Figura 15). Por outro lado, fêmeas não apresentaram um padrão temporal semelhante (Figura 16).

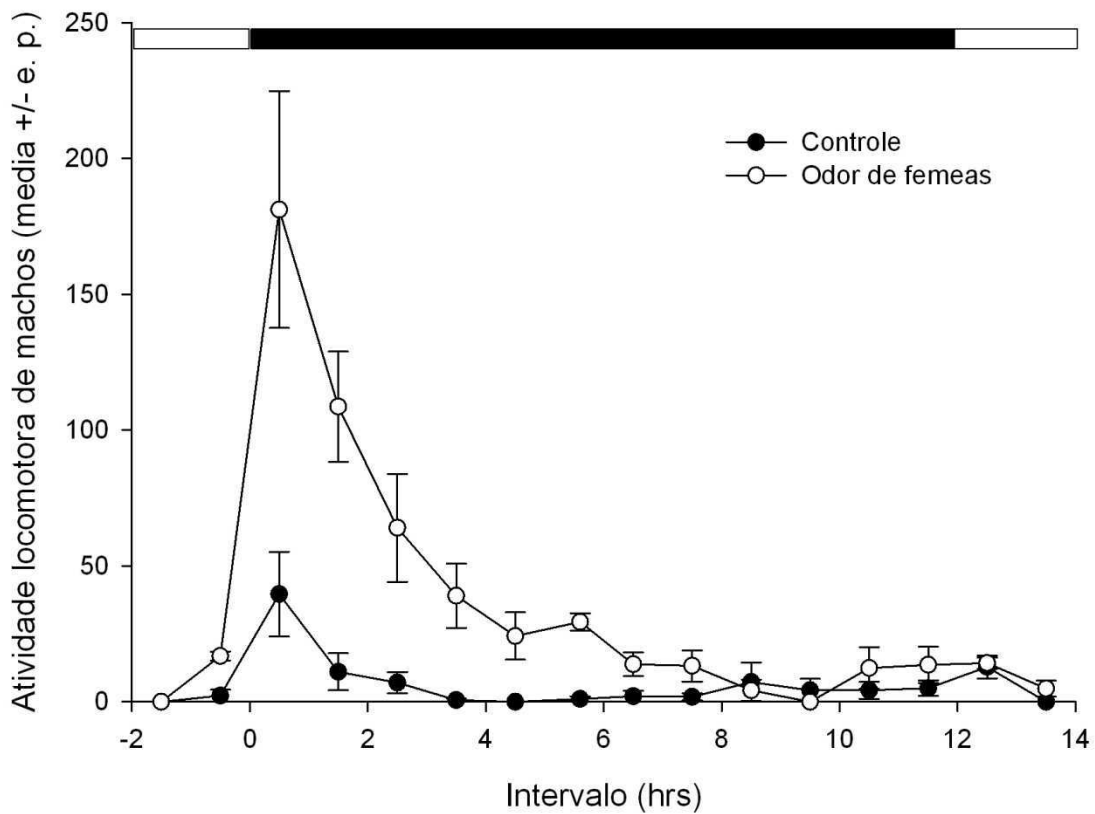


Figura 15- Padrão temporal da atividade locomotora de machos de *R. prolixus*. (●) Controle: atividade espontânea; e (○) Experimental: machos estimulados com odor de fêmeas. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase.

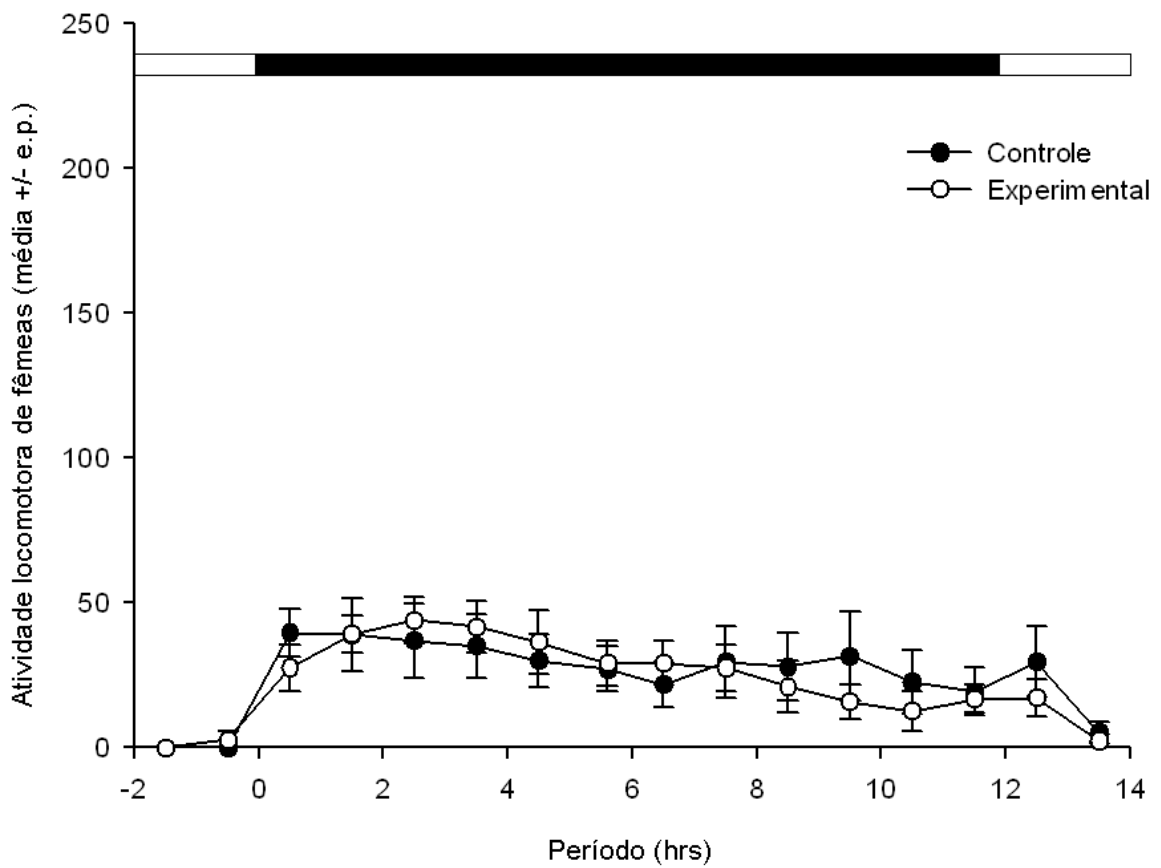


Figura 16- Padrão temporal da atividade locomotora de fêmeas de *R. prolixus*. (●)Controle: atividade espontânea; e (○)Experimental: fêmeas estimuladas com odor de machos. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase.



Um terceiro parâmetro, as tentativas de cópula entre machos, também foi avaliado neste experimento. Este comportamento é comumente observado entre machos de triatomíneos, que somente parecem reconhecer o sexo do parceiro após o contato. Entretanto, na presença de odor de fêmeas foi observado um aumento significativo no número destas tentativas de cópula (Figura 17; teste *t de Student para amostras pareadas*,  $p < 0,0008$ ). A representação da variação temporal mostrou que as tentativas de cópula entre machos aumentaram na presença de odor de fêmeas, mas somente durante as primeiras horas da escotofase (Figura 17).

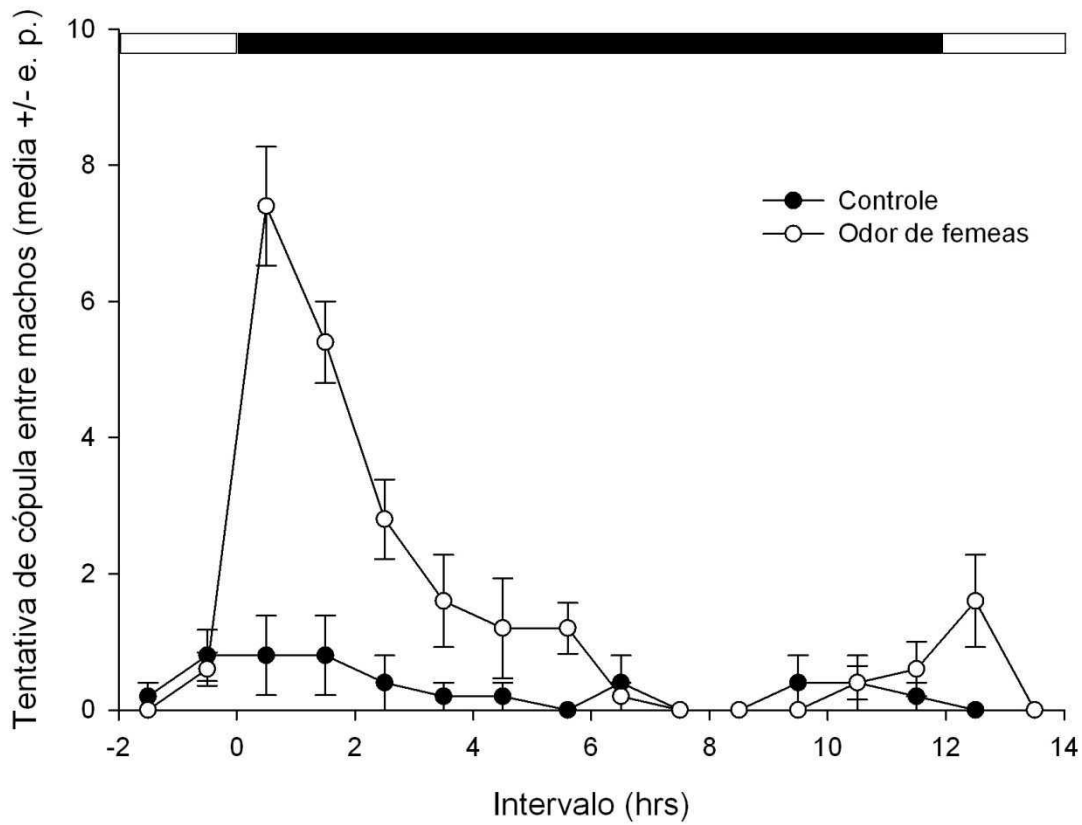


Figura 17- Padrão temporal de tentativas de cópula entre machos de *R. prolixus* nas séries: (●) controle: atividade espontânea; e (○) experimental: machos estimulados com odor de fêmeas. Os valores representam a média de seis réplicas por hora/série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase.

## 4.2 Ativação e orientação durante o início do voo de *Rhodnius prolixus* frente a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto

Através da análise dos registros em vídeo do comportamento dos insetos, foi possível observar que freqüentemente um inseto subia pela haste de madeira e que a partir desse momento, era habitual observar uma postura corporal característica e a movimentação das antenas em direção da corrente de ar (Figura 18 A-F).

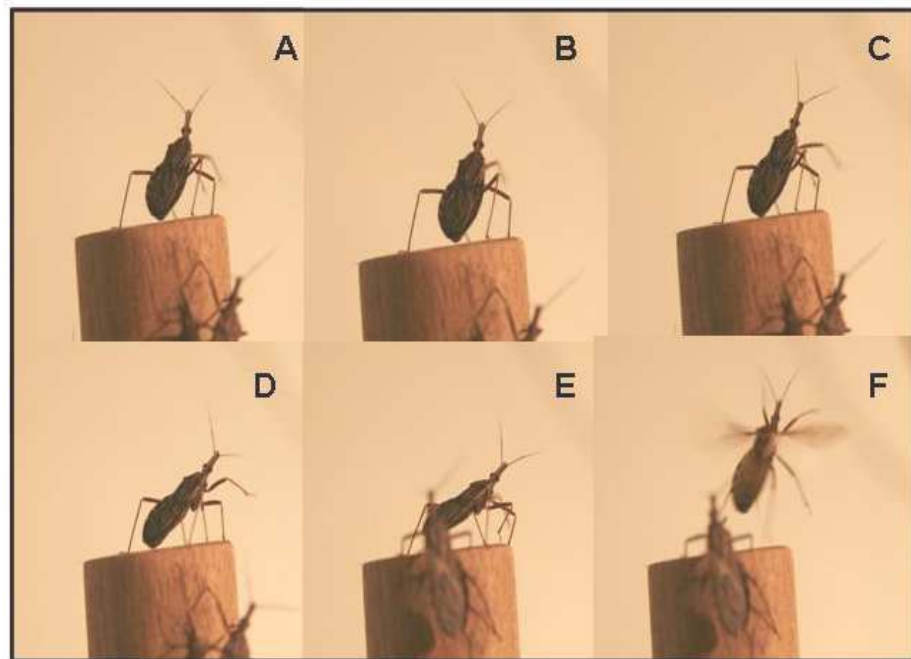


Figura 18- Macho de *R. prolixus* estimulado com uma corrente de ar transportando odor de fêmeas. Seqüência de fotos tiradas num intervalo de 1 segundo. Foto: Rodrigo Sinistro.

A análise estatística revelou uma interação entre os dois parâmetros testados, gênero e estímulo, indicando que machos e fêmeas respondem diferentemente aos vários estímulos apresentados (ANOVA 1 fator,  $F_{(2,18)}=12,63$ ,  $p<0,0004$ ). Além disso, a resposta de ativação dos machos variou significativamente de acordo com o estímulo, mostrando uma alta ativação na presença de odor de fêmeas (ANOVA,  $F_{(2,18)}= 11,94$ ,  $p <0,0005$ ).

Os resultados mostraram claramente que na presença de correntes de ar associadas com odor de fêmeas, os machos aumentaram a frequência de início de voo (Figura 19, 82.5%), quando comparada com a observada na presença de correntes de ar limpo (Figura 19, 33.7%, Tukey,  $p<0,05$ ) ou de correntes associadas com odor de machos (Figura 19, 37.5%, Tukey,  $p<0,05$ ). A comparação entre os ensaios controle (ar limpo) e na presença de correntes associadas a odor de machos não se mostrou significativa (Figura 19, Tukey, N.S.). Fêmeas não mostraram diferenças significativas na sua tendência de iniciar o voo na presença dos diferentes estímulos testados (ANOVA, N.S.). Especificamente, as fêmeas não mostraram diferenças significativas quando confrontadas com correntes de ar associadas a odor de machos (21.2%), fêmeas (47.5%) ou correntes de ar limpo (Figura 19, 37.5%; ANOVA,  $F_{(2,18)}= 2.85$ ,  $p=0,08$ ).

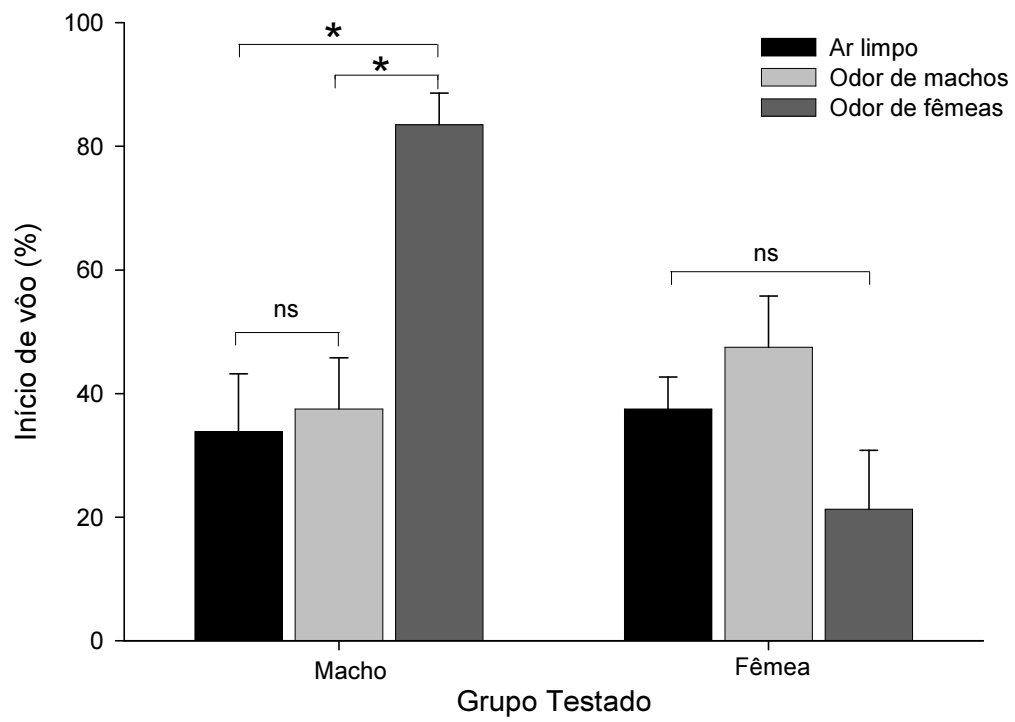


Figura 19. Frequência de início de vôo em adultos de *Rhodnius prolixus* (\*Tukey,  $P < 0.05$ ).

Machos mostraram uma acentuada tendência a iniciar o voo na direção de correntes de ar associadas odor de fêmeas (Figura 20C;  $\mu=356,4^\circ$ ;  $r=0,88$ ; teste de Rayleigh,  $p < 0,0001$ ; teste V,  $p < 0,0001$ ). De maneira semelhante, as outras séries estudadas mostraram uma distribuição heterogênea dos dados na presença de correntes de ar limpo (Figura 20A;  $\mu=11,7^\circ$ ;  $r=0,70$ ,  $p < 0,025$  teste de Rayleigh; teste V,  $p < 0,004$ ), e de odores de machos [Figura 20E;  $\mu=321,1^\circ$ ;  $r=0,82$ ,  $p < 0,002$  teste de Rayleigh; teste V,  $p < 0,004$ )

Fêmeas demonstraram uma distribuição uniforme dos dados em todos os ensaios nos quais foram estimuladas com correntes de ar limpo, associadas a odor de machos ou odores de fêmeas (Figura 20 B, D, F; teste de Rayleigh, NS).

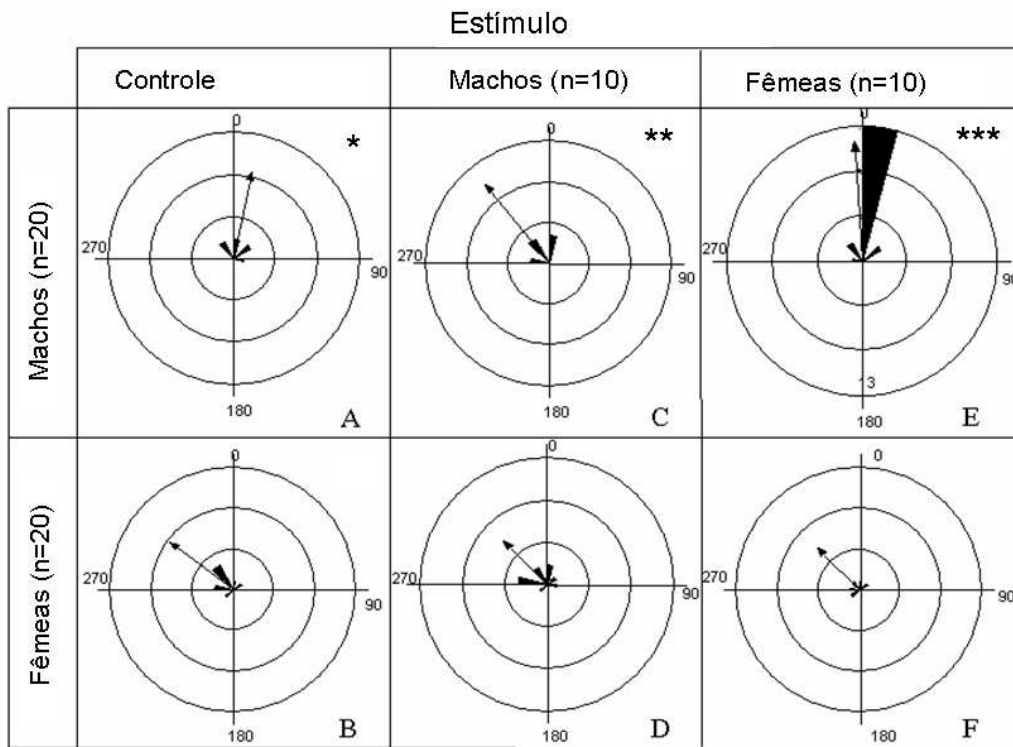


Figura 20- Orientação de *R. prolixus* durante início do voo frente a correntes de ar associadas a diferentes estímulos (a posição do estímulo foi convencionalmente designada como 0°). Asteriscos indicam que os dados não apresentaram uma distribuição uniforme e que houve orientação significativa na direção da corrente de ar. \* teste de Rayleigh,  $p < 0,025$ ; teste V  $p < 0,004$ ; \*\*  $p < 0,002$  teste de Rayleigh; teste V  $p < 0,004$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  teste de Rayleigh e teste V.

A partir destes resultados, foi planejado um novo experimento para determinar a possível fonte destes odores emitidos pelas fêmeas. Desta forma, estudamos o efeito da oclusão das glândulas exócrinas presentes nos adultos de triatomíneos, as glândulas metasternais e as glândulas de Brindley. Para isso, os orifícios das glândulas metasternais ou de Brindley de fêmeas foram ocluídos com parafina 24 hr antes da utilização das mesmas como fontes de voláteis nos testes com machos. A frequência de início de voo dos machos variou significativamente de acordo com os tratamentos (ANOVA de um fator,  $F(4) = 19.95$ ,  $p = 0,000007$ ). Em ensaios controle, nos quais a parafina era colocada num local diferente da cutícula das fêmeas, sem ocluir as glândulas, 72,5% dos machos iniciaram o vôo. Esses resultados não apresentaram diferença significativa com os obtidos com machos estimulados por correntes de ar associadas com odor de fêmeas intactas (82,5%, Tukey, NS). No entanto, uma diminuição significativa da atividade do voo dos machos foi verificada quando os orifícios da GMs das fêmeas utilizadas como fonte de voláteis foram ocluídos (23.7%, Tukey,  $p < 0,05$ ) ou quando os orifícios de ambos os tipos de glândulas foram ocluídos (GM + GB), (Figura 19, 23.3%, Tukey,  $p < 0,05$ ). Finalmente, a comparação com fêmeas intactas não mostrou mudanças significativas na frequência de início de voo dos machos testados frente a odor de fêmeas que tiveram os orifícios das GBs ocluídos 82,5 % (Figura 21, Tukey, NS).



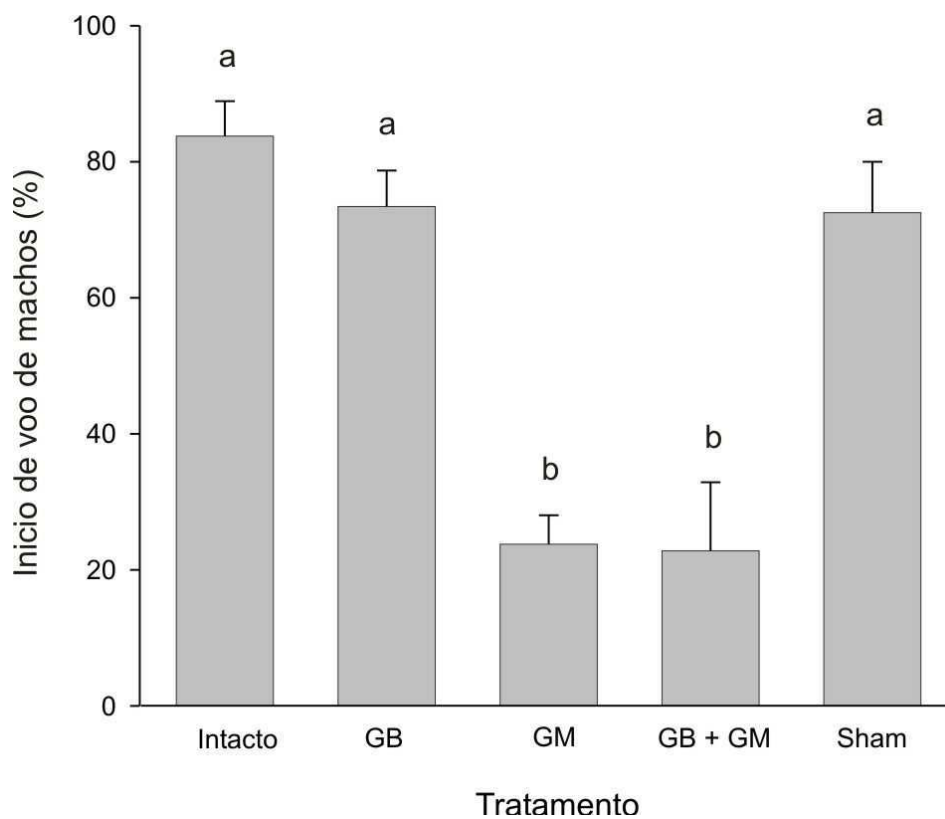


Figura 21- Frequência de início de vôo de machos de *Rhodnius prolixus* frente a correntes de ar associadas a diferentes fontes de odor (Tukey,  $p < 0,05$ ). Tratamentos: Intacto= odor de fêmeas intactas; GB= odor de fêmeas com os orifícios das GBs ocluidos; GM= odor de fêmeas com os orifícios das GMs ocluidos; GB+GM= odor de fêmeas com os orifícios das GBs e GMs ocluidos; sham= odor de fêmeas tratadas com parafina sem ocluir os orifícios das glândulas exócrinas.

Adicionalmente, a resposta dos machos foi analisada frente à estimulação com uma amostra de GMs dissecadas de fêmea. Os resultados obtidos demonstram que a frequência de início de voo dos machos (60%) não foi significativamente diferente da observada quando foram estimulados com odor de fêmeas intactas (Tukey, NS). Entretanto, as amostras controle, compostas de peças de tecidos internos e cutícula não pareceram promover o voo dos machos de maneira semelhante (34%, Figura 22, Tukey,  $p < 0,05$ ).

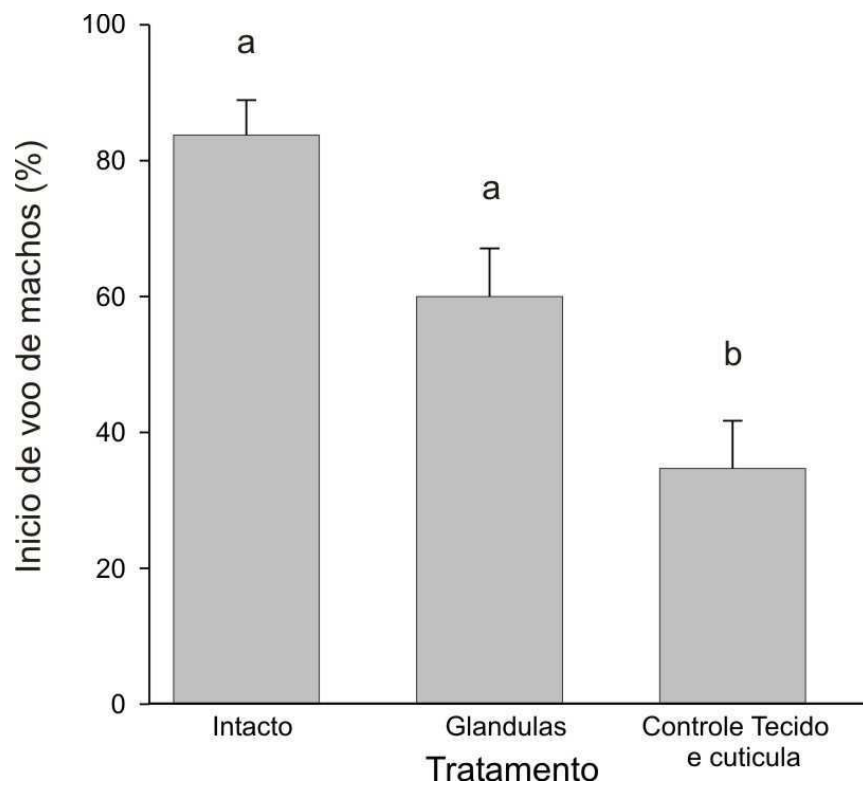


Figura 22- Frequência de início de vôo de machos de *Rhodnius prolixus* frente a correntes de ar associadas a diferentes fontes de odor (Tukey,  $p < 0,05$ ). Tratamentos: Intacto= odor de fêmeas intactas; Glândulas= pool de 10 GMs; Controle tecido e cutícula= 10 amostras de tecido e cutícula.

Machos mostraram uma atividade de voo orientada em direção a correntes de ar associadas a odores de glândulas de fêmeas sham (Figura 23, teste de Rayleigh,  $\mu=346,2^\circ$ ,  $r=0,72$ ; teste V,  $p=0,007$ ). De maneira semelhante, o restante dos dados destes experimentos mostrou uma distribuição heterogênea. Os machos iniciaram voos significativamente orientados na presença de correntes de ar associadas com odor de fêmeas cujas GMs foram ocluídas com parafina (Figura 23, teste de Rayleigh,  $\mu=357,23^\circ$ ,  $r=0,97$ ,  $p=0,007$ ; teste V,  $p=0,001$ ); com odor de fêmeas com os orifícios das GMs e GB ocluídos com parafina (Figura 23, teste de Rayleigh,  $\mu=8,0^\circ$ ,  $r=0,99$ ,  $p=0,007$ ; teste V,  $p=0,001$ ); com odor de uma preparação com 10 glândulas metasternais (Figura 23, teste de Rayleigh,  $\mu=19,6^\circ$ ,  $r=0,88$ ,  $p=0,002$ ; teste V,  $p=0,005$ ). E finalmente um controle de peças de cutícula e tecido (Figura 23, teste de Rayleigh,  $\mu=336,72^\circ$ ,  $r=0,67$ ,  $p=0,026$ ; teste V,  $p=0,03$ ). Desta forma, em todas as séries, os machos apresentaram uma distribuição heterogênea no início de vôo evidenciando novamente uma tendência direcional frente as correntes de ar, independentemente do odor associado.

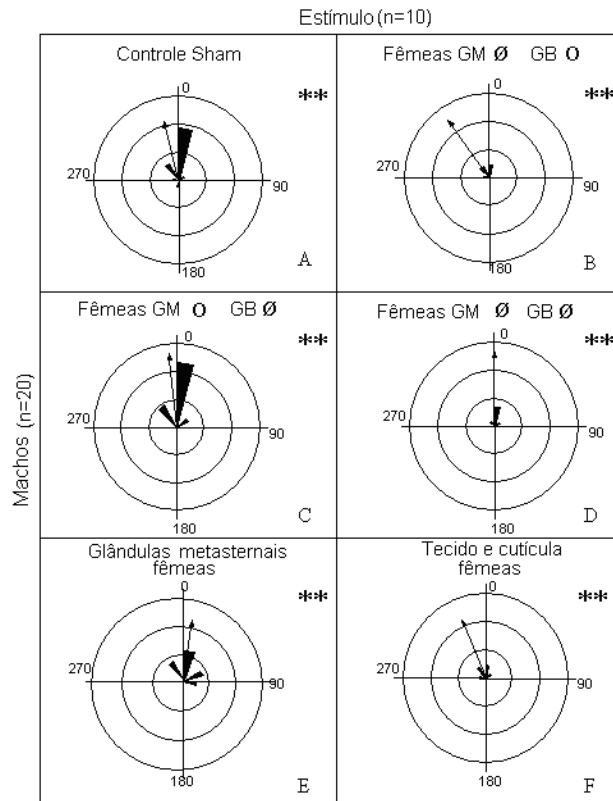


Figura 23- Frequência e direção do início de vôo de machos de *R. prolixus* em relação aos diferentes estímulos apresentados. \*\*dados distribuídos não uniformemente, i.e. orientação (teste de Rayleigh,  $P \leq 0.05$ ). A orientação ocorreu sempre em direção à corrente de ar (teste V,  $P \leq 0.05$ ) Controle sham= correntes de ar associadas com odor de fêmeas tratadas com parafina sem ocluir glândulas exócrinas. Fêmea GM Ø GB O = correntes de ar associadas com odor de fêmeas com GMs ocluídas com parafina. Fêmea MG O BG Ø = odor de fêmeas com glândulas de Brindley (GB) ocluídas. Fêmea MG O BG Ø = odor de fêmeas com GMs e GBs ocluídas. Glândulas = amostra de 10 GMs. Cutícula e tecido = controle de peças de cutícula e tecidos internos.

### **4.3 Orientação modulada por odor durante a locomoção de adultos de *Rhodnius prolixus***

Foi possível observar que os insetos se locomoveram normalmente, o que indicou que as condições de experimentação não inibiram a expressão normal do comportamento dos mesmos. Na figura 24 são apresentados exemplos de trajetórias descritas por nove insetos confrontados com diferentes estímulos. As figuras 24A-24C apresentam trajetórias sinuosas obtidas em diferentes situações: a) quando fêmeas foram confrontadas com duas correntes de ar limpo, b) quando confrontadas com uma corrente de ar limpo vs uma corrente associada a odor de fêmea e, c) quando confrontadas com ar limpo vs outra associada a odor de macho. Já quando fêmeas foram confrontadas com ar limpo vs uma corrente com odor de camundongo, foi possível observar trajetórias direcionadas e mais retilíneas (Figura 24D). As figuras 24E-24F mostram algumas das trajetórias obtidas com: a) machos confrontados com duas correntes de ar limpo e, b) machos confrontados com uma corrente de ar limpo vs outra associada a odor de macho. Nestes casos, também foram observadas trajetórias sinuosas. Entretanto, quando os machos foram confrontados com uma corrente de ar limpo vs outra associada a odor de fêmea, foram registradas trajetórias claramente lineares e direcionadas à corrente associada à fonte de odor (Figura 24G). Porém, o mesmo não foi observado quando os machos foram confrontados com uma corrente de ar limpo vs outra associada a odor de fêmeas que tiveram os orifícios das GMs ocluídos com parafina (Figura 24H). Entretanto, a orientação não foi afetada quando os machos foram confrontados com uma corrente de ar limpo vs outra associada com odor de fêmeas tratadas com parafina, mas sem ocluir os orifícios das suas GMs (Figura 24I).

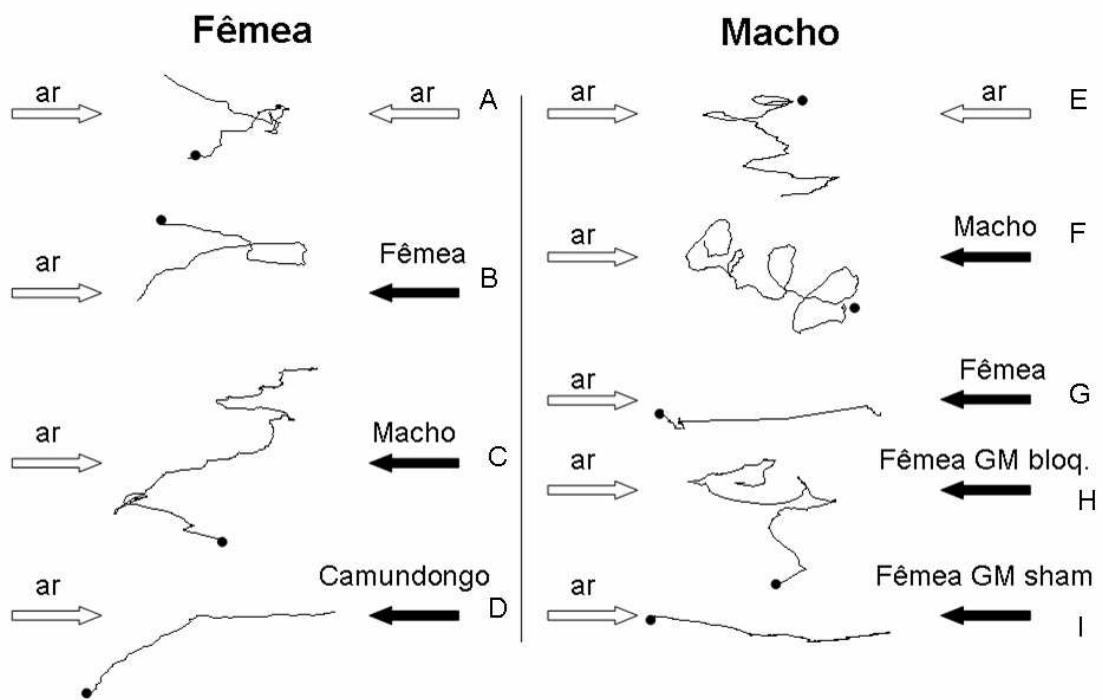


Figura 24- Exemplos de trajetórias individuais: (A)- Fêmea confrontada com duas correntes de ar limpo. (B)- Fêmea confrontada com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de fêmea. (C)- Fêmea confrontada com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de macho, e (D)- Fêmea confrontada com uma corrente de ar limpo vs outra associada a odor de camundongo. (E)- Macho confrontado com duas correntes de ar limpo. (F)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de macho. (G)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs e outra associada a odor de fêmea. (H)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs outra associada a odor de fêmeas que tiveram GMs ocluídas com parafina. (I)- Macho confrontado com uma corrente de ar limpo vs e outra associada com odor de fêmeas tratadas com parafina, mas sem ocluir as GMs.

Na figura 25 os histogramas circulares representam a frequência dos ângulos exibidos pelos insetos durante a sua locomoção. Fêmeas mostraram uma distribuição uniforme da sua orientação em todos os ensaios (Teste de Rayleigh, N.S.), a exceção da série em que foram confrontadas com uma corrente de ar associada a odor de camundongo. A estimulação das fêmeas com o odor de hospedeiro mostrou que estas apresentaram uma escolha significativa pela direção da corrente de ar associada com este odor (Figura 25,  $\mu=343,52^\circ$ ,  $r=0,51$ ; Teste de Rayleigh,  $p<0,002$ ; V-teste  $p<0,001$ ,). O cálculo dos diferentes índices de orientação de fêmeas indicou que houve orientação somente na série em que fêmeas foram confrontadas com correntes de ar associadas a odor de hospedeiro (Figura 25,  $IO=0,43$ ). A fim de comparar os índices de orientação de cada grupo experimental foi realizado um teste de ANOVA de um fator seguido por uma comparação de pares de médias pelo teste de Tukey. Esta análise demonstrou que o índice de orientação das fêmeas foi diferente dependendo do estímulo apresentado (ANOVA,  $f_{3,116}=10,42$ ,  $p<0,0001$ ) e que foi significativamente maior nas fêmeas confrontadas com odor de hospedeiro que nos outros tratamentos (Tukey  $p<0,0001$ )

O histograma circular da Figura 26 mostra que os machos apresentaram uma atividade locomotora orientada na direção das correntes de ar associadas com odor de fêmea ( $\mu=344,72^\circ$ ,  $r=0,40$ , Teste de Rayleigh,  $p<0,04$ ; Teste V,  $p<0,008$ ). Diferentemente, houve uma distribuição uniforme na direção média das trajetórias dos machos na presença de duas correntes de ar limpo ( $\mu=312,61^\circ$ ,  $r=0,24$ , Teste de Rayleigh,  $p<0,179$ ) ou quando confrontados com uma corrente de ar limpo vs outra associada com odor de macho ( $\mu=307,14^\circ$ , Teste de Rayleigh,  $r=0,10$ ,  $p<0,7$ ).

A partir destes resultados nosso estudo se direcionou na análise da possível fonte de odores emitidos pelas fêmeas. Investigamos desta forma a participação dos produtos das GMs de fêmeas na modulação das respostas anemotáticas dos



machos. Para isso, as GMs das fêmeas foram ocluídas 24 hr antes da sua utilização como fontes de odor. Em ensaios controle, nos quais a parafina aplicada às fêmeas não ocluída as glândulas, os machos apresentaram um direcionamento significativo nas suas trajetórias, se orientando no sentido da corrente de ar associada com a fonte de odor (Figura 26,  $\mu=333^\circ$ ,  $r=0,65$ , teste de Rayleigh,  $p < 0,0001$ ; Teste V,  $p < 0,0001$ ). Entretanto, quando machos foram confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmeas com as GMs ocluídas, este direcionamento nas respostas não foi observado ( $\mu=294^\circ$ ,  $r=0,26$ ; Teste de Rayleigh,  $p < 0,13$ ). Os índices indicaram orientação na direção da fonte de estímulo somente com os machos testados com odor de fêmeas intactas (IO=0,46) e fêmeas *sham* (IO=0,38). A fim de comparar os índices de orientação de cada grupo experimental foi realizado um teste de Kruskal-Wallis. Esta análise demonstrou que os índices de orientação dos machos estimulados com odor de fêmeas intactas e com odor de fêmeas *sham* foram significativamente maiores aos dos outros grupos (Figura 26, Kruskal-Wallis,  $f=4$   $p < 0,0001$ ).

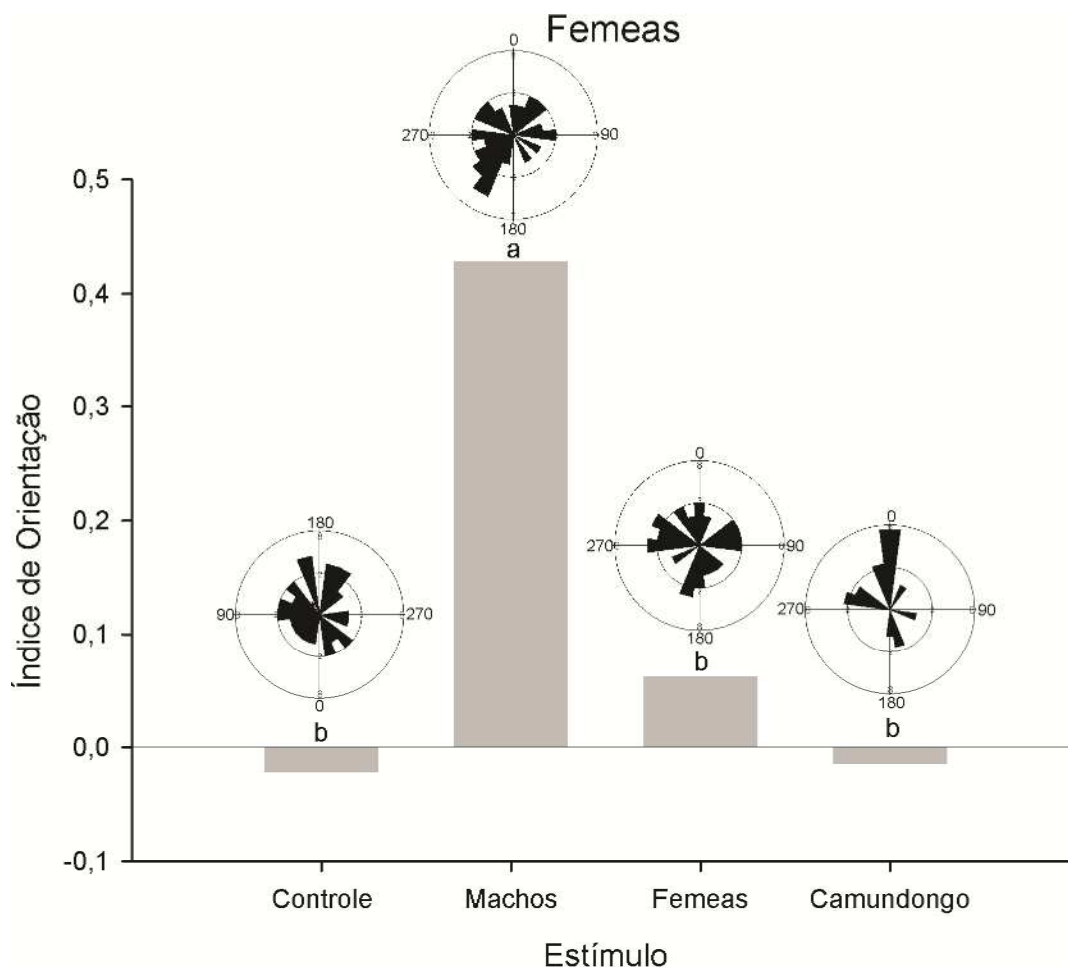


Figura 25- Orientação de fêmeas de *R. prolixus* frente a correntes de ar associadas a diferentes estímulos olfativos. O índice de orientação ( $IO = \cos \alpha_{m,r}$ ) é representado para as diferentes séries experimentais: 1 indica orientação na direção da corrente de ar associada à fonte de odor e, -1 indica orientação na direção oposta. Os histogramas circulares representam a distribuição de freqüência dos ângulos médios exibidos nas trajetórias dos insetos. Como convenção, a direção do estímulo foi atribuída ao ângulo de 0°. Diferentes letras denotam diferenças estatisticamente significativas, ANOVA,  $p < 0,0001$ ).

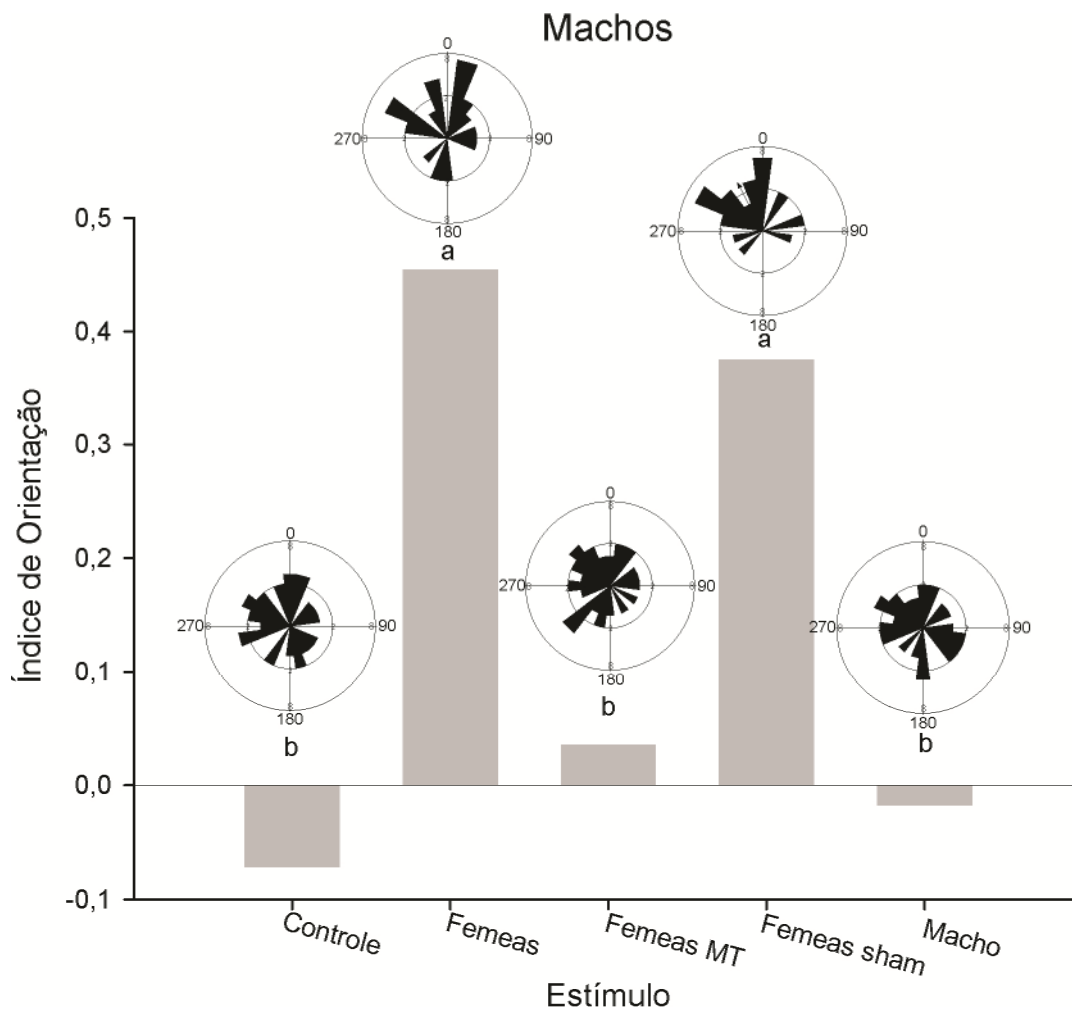


Figura 26- Orientação de machos de *R. prolixus* frente a correntes de ar associadas a diferentes estímulos olfativos. O índice de orientação ( $IO = \cos \alpha_{m.r}$ ) é representado para as diferentes séries experimentais: 1 indica orientação na direção da corrente de ar associada à fonte de odor e, -1 indica orientação na direção oposta. Os histogramas circulares representam a distribuição de freqüência dos ângulos médios exibidos nas trajetórias dos insetos. Como convenção, a direção do estímulo foi atribuída ao ângulo de  $0^\circ$ . Diferentes letras denotam diferenças estatisticamente significativas, Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ).

#### **4.4 Agregação sexual em *Rhodnius prolixus***

Os resultados obtidos estudando o comportamento sexual de 4 machos com uma fêmea intacta permitiram comprovar que após o início da cópula os machos livres na arena tendiam a se agregar em volta do par em cópula (Figura 27). Este comportamento não foi observado com fêmeas, já que o número de fêmeas ao redor do casal em cópula permaneceu inalterado após o início da cópula (Figura 28). Adicionalmente, não observamos uma tendência de agregação espontânea de machos na ausência de um casal em cópula (Figura 29). Estes resultados suportam a existência do sinal de agregação liberado pelo casal em cópula, afetando o comportamento dos machos.

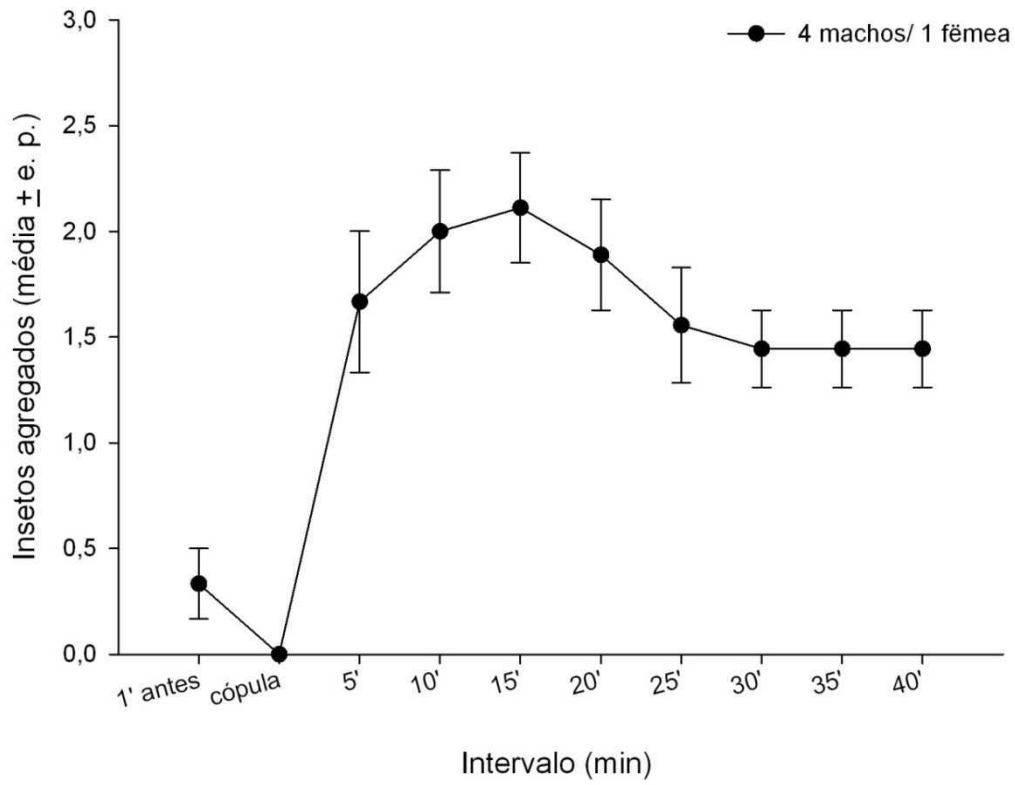


Figura 27- Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1F: 4 machos e uma fêmea intacta (n=9).

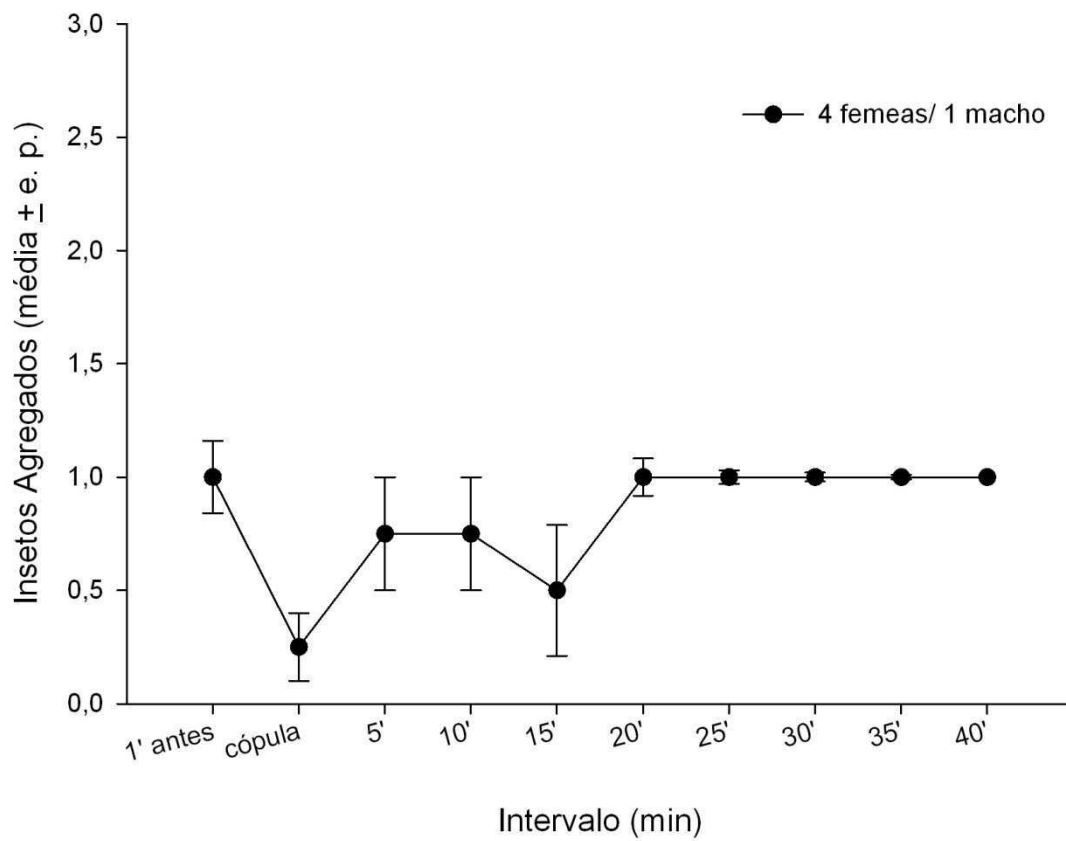


Figura 28- Número médio de fêmeas agregadas ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4F:1M: 4 fêmeas e um macho intacto (n=9).

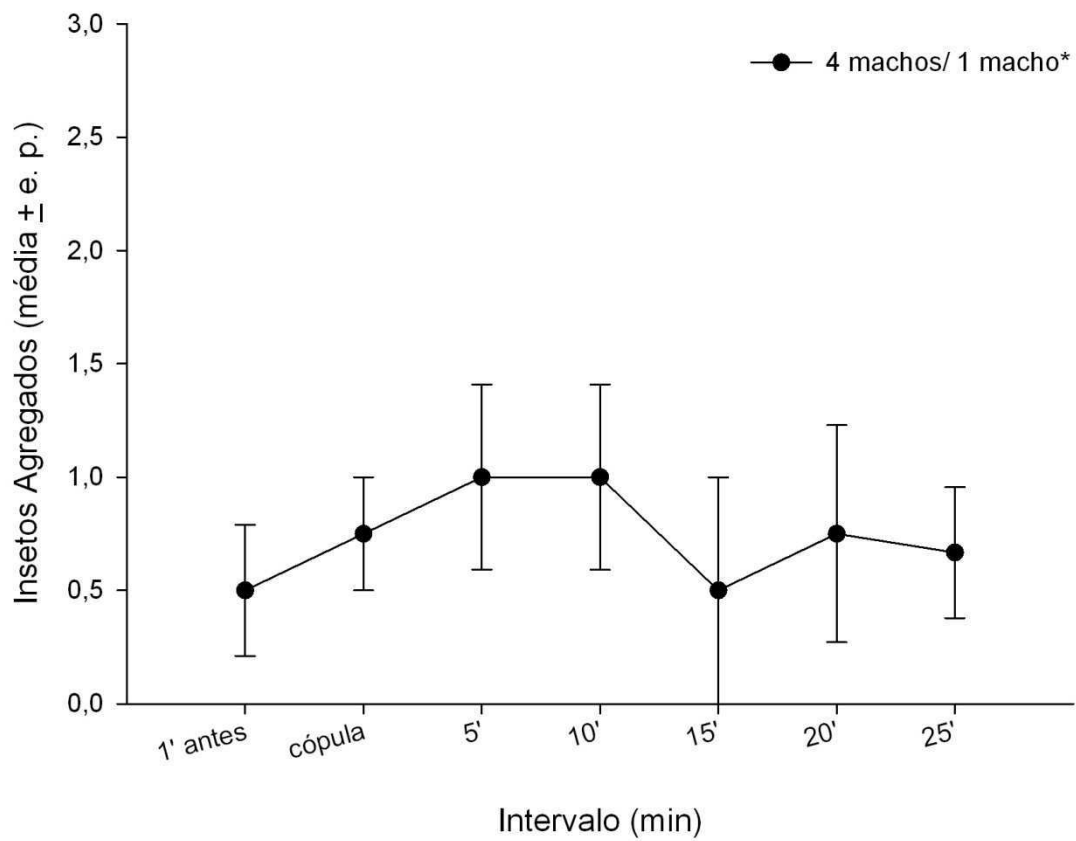


Figura 29- Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1M: 4 machos e um macho intacto (n=9).

Para verificar a origem do sinal químico que induz a agregação dos machos em volta dos casais em cópula, ocluímos as GMs de um grupo de fêmeas a utilizar como potenciais fontes de odor. Na série em que 4 machos intactos foram testados com uma fêmea com as GMs ocluídas, os resultados mostraram que não houve agregação de machos na ausência de odores das GMs de fêmeas (Figura 30). Uma série controle (*sham*) foi realizada a fim de verificar se havia um efeito conseqüente da aplicação de parafina nos insetos. Esta manipulação não afetou a agregação de machos em torno dos casais em cópula (Figura 31). Na última série analisamos se a ausência dos odores de GMs de macho podia afetar a agregação dos mesmos durante a cópula. Na ausência de odor de GMs de macho, houve agregação de machos ao redor do casal em cópula (Figura 32). Assim, os resultados apresentados neste experimento demonstram a existência de agregação nos seguintes grupos estudados: 4M1F, 4M1Fsham, 4Mmt1F (Qui-quadrado=31,45;  $p < 0,0001$ ).



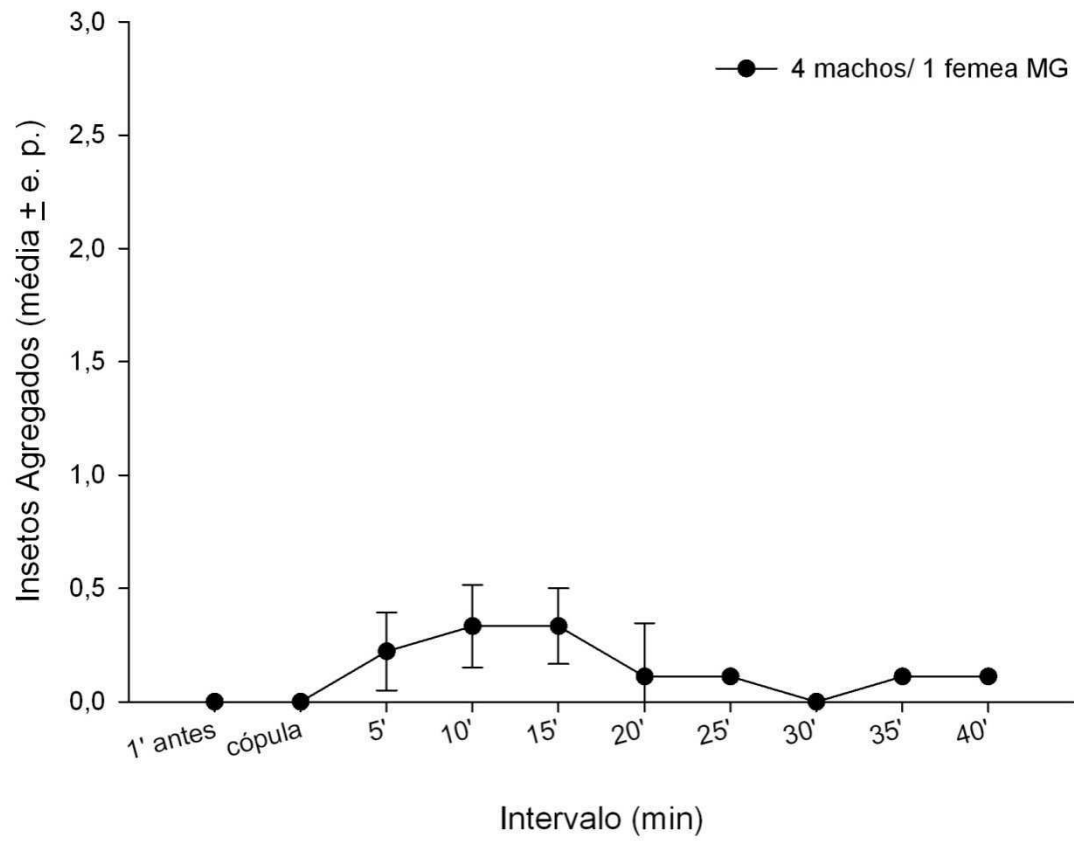


Figura 30- Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1FMG: 4 machos intactos e uma fêmea com os orifícios das GMs ocluídos (n=6).

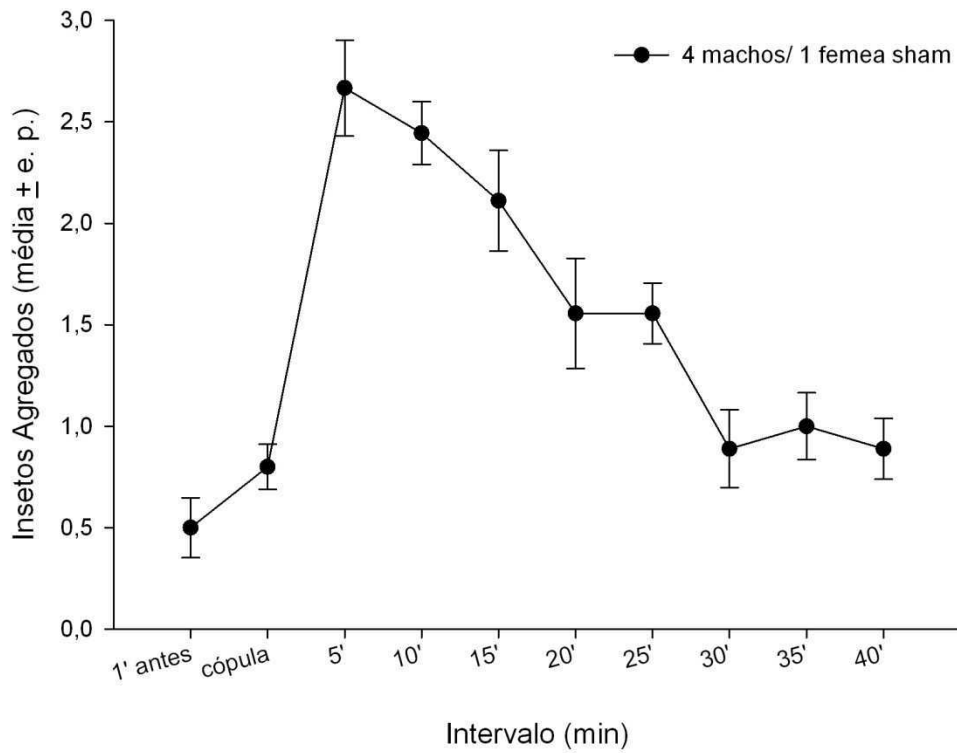


Figura 31- Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4M:1Fsham: 4 machos intactos e uma fêmea tratada com parafina, sem ocluir os orifícios das GMs (n=9).

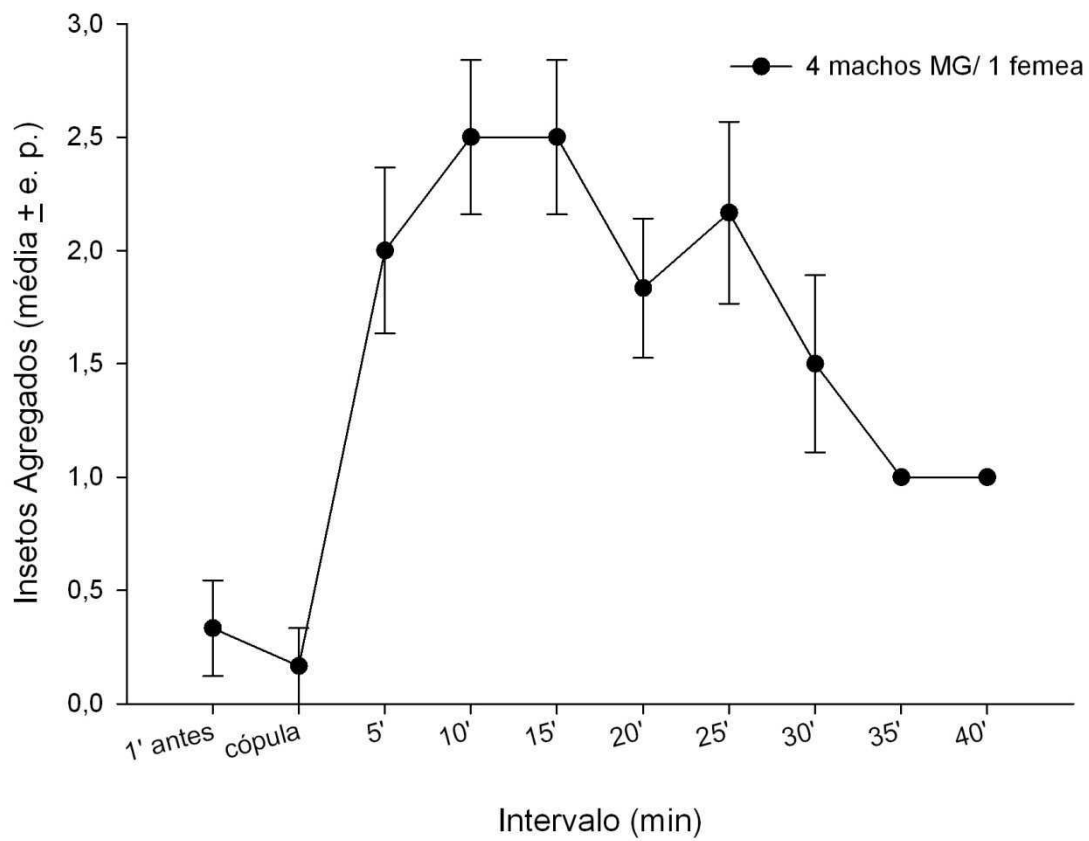


Figura 32- Número médio de machos agregados ao redor do casal em cópula em função do tempo. 4Mmt:1F: 4 machos com os orifícios das GMs ocluídos e uma fêmea intacta (n=6).

A frequência de cópula também variou entre as diferentes séries desenvolvidas. Nos ensaios com 4 machos e 1 fêmea, foram realizadas 12 tentativas de cópula, sendo que os insetos copularam em 9 dos ensaios (75%). Nos ensaios com 4 fêmeas e 1 macho, foram observadas 11 tentativas de cópula, e 9 ensaios (81,8%) apresentaram cópula. Na série com 4 machos e 1 fêmea com GMs ocluídas observamos somente 6 ensaios com cópula dos 22 realizados (27,27 %); i.e., o sucesso de cópula dessa série foi significativamente menor em relação às outras (Qui-quadrado de partição  $p < 0,0005$ ). Adicionalmente, quando 4 machos intactos foram liberados com uma fêmea *sham*, a relação observada foi de 9/11 (81,8%). Finalmente, quando 4 machos com as GMs ocluídas foram liberados junto com uma fêmea intacta, a proporção foi intermediária 6/11 (54,5%) (Tabela 1).

A duração média da cópula foi relativamente similar em todas as séries apresentadas, com a exceção da série realizada com 4 machos e 1 fêmea com as GMs ocluídas (Tabela 1). Entretanto, e de acordo com a análise estatística, esta diferença não foi significativa (ANOVA,  $p = 0,07$ ).

A existência e duração das associações pós-cópula (APC) foi outro fator avaliado neste estudo. O tempo de associação pós-cópula foi definido como o tempo que o macho ficava encima da fêmea após a separação do edeago da genitália feminina. Não foram observadas diferenças significativas na duração deste comportamento nas séries apresentadas (Tabela 1, Kruskal-Wallis,  $p = 0,18$ ).

Somente nas séries com 4 machos e 1 fêmea e 4 machos e 1 fêmea *sham* foi observada a ocorrência de uma segunda cópula. Ou seja, nestas condições algumas fêmeas copularam com mais de um macho. Um máximo de duas cópulas foi observado em 4 ensaios dessas séries de ensaios. Não foi observado um comportamento de agregação sexual dos machos em volta do par em cópula em nenhuma destas duas séries durante a segunda cópula (Tabela 1). Como não foi

observada mais de uma cópula na série com 4 fêmeas e um macho, a fim de verificar o potencial de cópula dos machos foram realizados 4 ensaios adicionais destas mesmas séries. Estes ensaios foram filmados durante 24 hr. O objetivo foi verificar se neste período, após a primeira cópula, o mesmo macho copularia com outra/s fêmea/s. Não foi possível observar cópulas subsequentes realizadas pelo mesmo macho dentro de um período de 24 horas.

Tabela 1- Parâmetros do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* nos diferentes grupos experimentais.

Grupo experimental	N	Frequência de cópula	Duração da cópula (min)	Associação pós-cópula (min)	Segunda cópula (%)
4M/1F	9	9/12 (75%) <sup>a</sup>	40.2 ± 6.5 <sup>a</sup>	6.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	45
4F/1M	9	9/11 (81.8%) <sup>a</sup>	34.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	4.6 ± 1 <sup>a</sup>	-
4M/1M*	9	-	-	-	-
4M/1F MG	6	6/22 (27.3%) <sup>b</sup>	37.9 ± 3.5 <sup>a</sup>	-	-
4M/1F sham	9	9/11 (81.8%) <sup>a</sup>	37 ± 4.7 <sup>a</sup>	4.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	45
4MMG/1F	6	6/11 (54.5%) <sup>a</sup>	20.5 ± 4.7 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	-

4M/1F = 4 machos/ 1 fêmea, 4F/1M = 4 fêmea/ 1 macho, 4M/1M\*= 4 machos/ 1 macho marcado, 4M/1F MG= 4 machos/ 1 fêmea com os orifícios das GMs ocluidos com parafina, 4M/1F sham= 4 machos/ 1 fêmea tratada com parafina sem ocluir os orifícios das GMs, e 4MMG/1F= 4 machos com os orifícios das GMs ocluidos com parafina/ 1 fêmea. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas entre os valores.

A figura 33 representa de uma forma ilustrativa a seqüência comportamental apresentada pelos machos de *Rhodnius prolixus* em diferentes tratamentos. Na primeira seqüência (A), foi observado o comportamento de agregação de machos quando estes foram testados junto com uma fêmea intacta (4 machos/1 fêmea). Na seguinte seqüência (B) observa-se uma ausência de agregação dos machos quando a fêmea apresentava as GMs ocluídas (4 machos/1 fêmea GMs ocluídas).

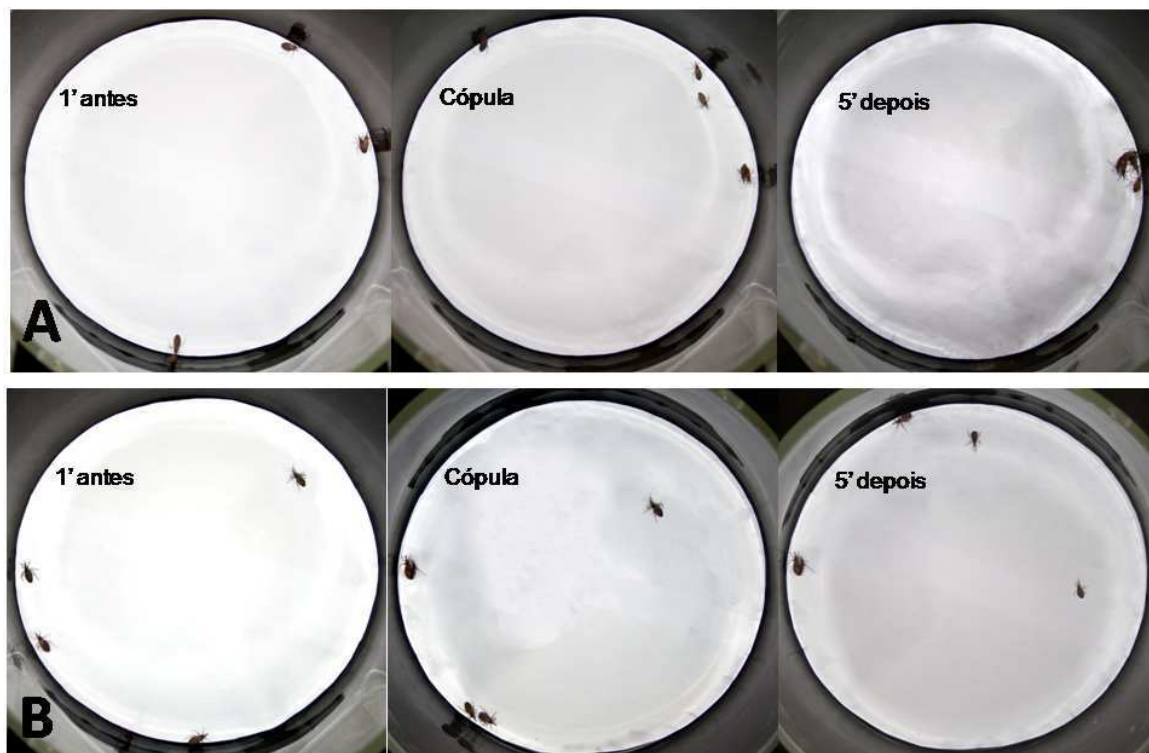


Figura 33- Sequência comportamental de machos de *Rhodnius prolixus* em diferentes condições experimentais. (A) Comportamento de agregação de machos frente a uma cópula com fêmea intacta (4 machos/1 fêmea). (B) Ausência de agregação de machos quando a fêmea apresentou as GMs ocluídas (4 machos/1 fêmea GMs ocluídas).

# Discussão

---



## 5 Discussão

### 5.1 Dinâmica de uso de abrigos em adultos de *Rhodnius prolixus*: a atividade locomotora modulada por sinais sexuais

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível ampliar nosso conhecimento sobre a biologia do inseto vetor *R. prolixus*. Sabe-se que durante o dia, os triatomíneos, normalmente permanecem dentro de abrigos protegendo-se de predadores (Settembrini 1984). Durante este período, o nível de atividade se mantém baixo, ficando os insetos em um estado de imobilidade denominado *akinesis* (Wigglesworth & Gillet 1934). Uma série de comportamentos, a maioria deles de expressão rítmica controlada de maneira endógena, faz com que estes insetos permaneçam inativos no interior dos abrigos. Dentre eles, os principais são a sua *tigmotaxia*, *i.e.*, a sua tendência a procurar contato físico com o substrato e conespecíficos, e o comportamento de agregação mediado por pistas químicas voláteis e de contato (Lorenzo & Lazzari 1996; 1999; Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998). Ao anoitecer, os triatomíneos podem abandonar seu estado de *akinesis* e iniciar a busca de alimento (Lorenzo & Lazzari, 1998). Ao mesmo tempo, sua motivação para a alimentação aumenta (Núñez 1982, Settembrini 1984, Lazzari 1992, Guerenstein & Guerin 2001, Barrozo & Lazzari 2003, Barrozo & Lazzari 2004a, 2004b) e os sinais originados no hospedeiro tornam-se atrativos (Barrozo & Lazzari 2003, Barrozo & Lazzari 2004a, 2004b). Os resultados gerados neste trabalho indicam que nas primeiras horas da fase escura os machos de *R. prolixus* podem apresentar uma maior tendência a abandonar os seus abrigos e uma maior atividade locomotora subsequente na presença de odor que evidencia a presença de fêmeas nas proximidades. Adicionalmente, um maior número de tentativas de cópula entre machos é desencadeado pela presença de sinais emitidos por fêmeas. Desta forma, sugerimos que as fêmeas emitem sinais voláteis que promovem a

saída dos machos de dentro dos refúgios e posteriormente intensificam a atividade locomotora dos mesmos. O mesmo resultado não foi observado com fêmeas, sugerindo que machos não emitem sinais que promovam um aumento significativo na atividade locomotora das fêmeas. Entretanto, comparando o número de saídas do abrigo nos ensaios controle com machos e fêmeas, observamos que as fêmeas saíram significativamente mais dos abrigos do que os machos. Sugerimos que, fêmeas saem do abrigo nestas condições fisiológicas em busca do hospedeiro.

A dinâmica do uso de abrigos associada com a busca ao hospedeiro foi descrita por Lorenzo & Lazzari (1998) em *T. infestans*, revelando que durante a noite duas diferentes atividades são divididas em diferentes janelas temporais, e.g., a saída e o retorno ao abrigo, durante a primeira e segunda metade da noite, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que quando machos são estimulados com odor de fêmeas, uma intensa atividade locomotora é observada nas primeiras horas da escotofase. Estes resultados sugerem que os machos exibem uma maior motivação para a procura de parceiro sexual durante as primeiras horas da noite. Desta forma, os insetos evitam uma exposição aos seus potenciais predadores durante o dia, protegendo-se dentro dos abrigos. Lorenzo & Lazzari (1998) propõem que os dois picos de atividade apresentados por *T. infestans* estão relacionados à motivação para encontrar um hospedeiro e a busca de abrigo. Neste trabalho, podemos sugerir que o padrão com dois picos de atividade exibido por machos *R. prolixus* estaria relacionado com a busca de parceira sexual no início da noite e seu retorno ao abrigo no final da noite a fim de encontrar proteção durante as horas do dia. O aumento significativo registrado no número de tentativas de cópula, restrito às primeiras horas da escotofase, parece confirmar a existência de uma maior motivação sexual dos machos durante este período. Experimentos que confirmem a ritmicidade do comportamento sexual dos machos são necessários

para confirmar se o maior número de saídas do abrigo dos machos restrito ao início da noite é devido à sua motivação restrita a uma janela específica, à emissão de sinais por parte das fêmeas de maneira rítmica ou à convergência de ambos os fenômenos mencionados.

Desta maneira, os dados obtidos sugerem que as atividades que formam parte da biologia destes insetos parecem estar controladas por relógios endógenos e restritas às mesmas janelas temporais. A única exceção parece ser a atividade de busca de abrigo, fundamentalmente expressa no fim da fase escura. A relevância dos insetos permanecerem fora dos abrigos durante o restante da escotofase poderia estar relacionada com uma maior eficiência na detecção e busca de sinais relacionados aos recursos cuja demanda não tem sido satisfeita. Experimentos que avaliem esta hipótese são necessários para melhor entender estes aspectos do comportamento dos triatomíneos. Este tipo de informações é extremamente relevante devido ao fato de que o controle destes insetos baseia-se atualmente na aplicação de inseticidas e que a eficiência de tais procedimentos é grandemente afetada pelo grau de exposição dos insetos. A compreensão dos estímulos que induzem a saída dos abrigos e da sua eficácia diferencial de acordo com a fase do ciclo diário é relevante para o desenho de novas estratégias de controle ou para a adequação das existentes.

## **5.2 Ativação e orientação durante o início do voo de *Rhodnius prolixus* frente a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto**

Neste trabalho analisamos se adultos conespecíficos podem atuar como fonte de estímulos que induzam o início do voo de *R. prolixus*. Adicionalmente, avaliamos se os insetos mostram uma orientação significativa durante esta atividade. Este é o primeiro estudo a demonstrar a existência de orientação modulada por odor durante o início do voo de *R. prolixus*. Especificamente, nossos experimentos demonstraram que a expressão desta atividade nos machos é aumentada significativamente na presença de odores emitidos por fêmeas. A possível existência de mecanismos de orientação mediada por odor durante o voo não tinha sido avaliada para triatomíneos até que o presente estudo e um trabalho paralelo (Vitta 2009) desenvolvido no mesmo laboratório demonstraram que machos iniciam o voo com maior frequência em presença de odor emitido por fêmeas de *R. prolixus* e *Triatoma brasiliensis*.

Particularmente, quando machos de todos os grupos foram estimulados correntes de ar associadas ou não a odores foi possível observar orientação significativa na direção da corrente de ar, demonstrando anemotaxia positiva. Barrozo et al. (2003), descreveram um comportamento anemotático positivo durante a marcha de ninfas de 5º estágio de *T. infestans*.

Neste estudo, verificamos que a ativação dos machos é significativamente mais intensa na presença de odor de fêmeas. Este achado demonstra que os machos são ativados pela presença do odor de fêmea nas correntes de ar. Os resultados são especialmente relevantes uma vez que a atividade de voo dos triatomíneos está relacionada com a sua dispersão e subsequente colonização de novos habitats (Sjogren & Ryckman 1966; Lehane & Schofield 1976; Schofield & Matthews, 1985; Cecere et al., 2004; Vazquez-Prokopec et al., 2004; Ceballos et al., 2005).

Foi demonstrado que a ausência dos odores das GMs das fêmeas afetou o início do voo dos machos. Este fato sugere o envolvimento dos produtos desta glândula na mediação do comportamento sexual dos machos desta espécie. Crespo & Manrique (2007), relataram a importância desta glândula para a ocorrência da cópula, assim como para a agregação de *T. infestans*. Coincidentemente, Pontes et al. (2008) demonstraram que na ausência dos compostos das GMs de machos e fêmeas a frequência da cópula é drasticamente diminuída em *R. prolixus*. No presente estudo, a oclusão das GMs induziu uma significativa diminuição na frequência de início do voo de machos desta espécie. Por outro lado, a eliminação dos odor das GBs não alterou a frequência de início do voo dos machos, sugerindo que seus produtos voláteis não induzem o início do voo nesta espécie. Entretanto, os produtos das GBs tem sido associados com uma função sexual por outros autores (Rojas et al., 2002, Fontán et al., 2002).

A importância dos odores das GMs de fêmeas na ativação do início do voo de machos de *R. prolixus* foi reforçada pelos resultados obtidos com amostras de glândulas dissecadas de fêmeas, que induziram uma frequência de início de voo que não mostrou diferença significativa com a observada com machos estimulados com fêmeas intactas. Desta forma, sugerimos a existência de sinais químicos produzidos pelas GMs de fêmeas que promovem uma ativação do início do voo dos machos em *R. prolixus*.

Sugerimos então que os machos *R. prolixus* podem investir mais recursos no encontro da parceira sexual e que esta atividade pode envolver a orientação a longas distâncias através do vôo. Os resultados aqui apresentados sugerem a existência de um mecanismo de orientação que pode permitir que machos de *R. prolixus* localizem ecótopos colonizados por fêmeas. Estudos de semi-campo ou desenvolvidos no ambiente silvestre deverão avaliar estas hipóteses e testar se

misturas sintéticas destes compostos podem ser utilizadas para atrair machos desta espécie. Os resultados também parecem confirmar a existência de um aparente “chamado” químico realizado pelas fêmeas durante a escotofase (Pontes et al. 2008) de maneira semelhante ao conhecido para outras espécies de insetos noturnos.

A atividade de vôo dos triatomíneos pode ser modulada por fatores fisiológicos (Lehane & Schofield 1981, 1982, Lehane et al, 1992;. McEwen et al. 1993; McEwen & Lehane, 1993, 1994, Schofield et al. 1992; Gurevitz et al, 2006), entretanto, pouco se sabe sobre fatores externos que podem afetá-la. Alguns estudos avaliaram o efeito de estímulos externos no início do voo (Lehane et al. 1992; Gurevitz et al, 2006) e no seu direcionamento (Minoli & Lazzari, 2006). Nosso dispositivo experimental é uma versão modificada do originalmente apresentado por Minoli e Lazzari (2006), adaptado no presente estudo para avaliar o efeito de sinais olfativos. A identificação de compostos voláteis capazes de modificar o comportamento dos machos *R. prolixus*, atraindo-os a longas distâncias, permitiria o desenvolvimento de iscas para a sua detecção e controle. Para atingir esta meta, seria ainda necessário estabelecer quais dos compostos previamente identificados por Pontes et al. (2008) nas GMs de *R. prolixus* possuem um papel como sinais de ativação do voo e subsequente orientação durante o mesmo.

### **5.3 Orientação modulada por odor durante a locomoção de adultos de *Rhodnius prolixus***

Neste estudo, demonstramos que machos adultos de *R. prolixus* possuem um mecanismo de orientação durante a sua locomoção que é modulado por odores emitidos por fêmeas, desta forma sugerimos que machos de *R. prolixus* são capazes de reconhecer sinais químicos produzidos pelas fêmeas e orientar-se ativamente até a elas.

Nossos resultados demonstraram que machos e fêmeas expostos a duas correntes de ar limpo apresentadas em direções opostas mostraram trajetórias sem orientação definida. No entanto, machos de *R. prolixus* apresentaram uma clara tendência de orientação na direção de correntes de ar associadas a odor de fêmeas através da marcha. Diferentemente, os machos não apresentaram trajetórias orientadas na presença de odor de machos nas correntes de ar. É importante ressaltar que Pontes et al. (2008) relataram uma maior frequência de emissão de compostos das GMs em fêmeas, do que em machos desta espécie.

Em suma, os resultados mostram que as substâncias produzidas pelas GMs das fêmeas certamente estão envolvidas na comunicação sexual destes insetos, promovendo a orientação dos machos durante a marcha mediante um mecanismo anemotático modulado por odor. O presente trabalho não avaliou no compensador de marcha se as secreções das glândulas de Brindley das fêmeas possuem um efeito sobre o comportamento dos machos, portanto, isto precisa ser avaliado. Apesar de ambos os sexos apresentarem o mesmo perfil de substâncias nas GMs de *R. prolixus* (Pontes et al. 2008), nos nossos experimentos, apenas a secreção das fêmeas foi capaz de desencadear respostas de orientação nos machos. É necessário determinar se a diferença na atratividade de machos e fêmeas é devida a

uma ausência de emissão de odores das GMs nos primeiros, como descrito por Pontes et al. (2008) ou a substâncias exclusivamente produzidas pelas fêmeas e que não foram detectadas nesse trabalho. As GMs de Heteroptera originalmente apresentam secreções com função de defesa, e pelo menos em alguns casos, evoluíram posteriormente para a produção de feromônios sexuais (Blum, 1996). É possível que os voláteis produzidos por estas glândulas tenham evoluído também para essa nova função de maneira parcimoniosa nos triatomíneos, uma vez que, adultos perturbados mecanicamente emitem as secreções das glândulas de Brindley e metasternais, simultaneamente (Vitta 2005, Manrique et al. 2006). A natureza multicomponente das secreções das glândulas deve ser considerada, levando em conta a existência de fenômenos de ativação, inibição e sinergismo que podem ocorrer na presença simultânea de diferentes componentes.

A noção de que os insetos dependem da detecção de odores para assegurar atividades fundamentais do seu ciclo de vida como acasalamento e alimentação fez surgir, nas últimas quatro décadas, novos conceitos no manejo e controle de insetos praga. A possibilidade de identificar estes estímulos químicos permitiu manipular seu comportamento e regular a sobrevivência de uma população com as chamadas substâncias químicas “modificadoras do comportamento” (Shorey 1973, Cardé & Elkinton 1984, McNeil 1991, Bento 2001). Nosso trabalho demonstrou que existem compostos químicos provenientes das GMs de fêmeas de *R. prolixus* que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de novos métodos de controle destes insetos praga.



#### 5.4 Agregação sexual em *Rhodnius prolixus*

Nossos resultados confirmam a existência de um sinal de agregação de machos que é emitido durante a cópula de *R. prolixus*, como relatado por Baldwin et al. (1971). Adicionalmente, demonstramos aqui que as GMs das fêmeas possuem um importante papel na promoção deste comportamento, já que na sua ausência a proporção de machos agregados foi significativamente menor. Desta forma, a ocorrência da cópula e o comportamento de agregação dos machos parecem depender da liberação de compostos voláteis produzidos pelas GMs de fêmeas. Estes resultados são consistentes com os apresentados por Manrique et al. (2006) e Pontes et al. (2008), que demonstraram que os compostos das GMs são liberados durante a cópula de *T. infestans* e *R. prolixus*, respectivamente. Além disso, Pontes et al. (2008) relataram que os compostos produzidos pelas GMs são emitidos espontaneamente por fêmeas durante a escotofase, demonstrando também que a oclusão das GMs de machos e de fêmeas induziu uma redução da frequência de cópula. Os resultados apresentados aqui demonstram uma redução significativa no sucesso de cópula somente na ausência dos odores da GM de fêmeas. Este dado inconsistente pode ser devido ao fato de que nos experimentos apresentados aqui foram utilizados grupos de cinco insetos, aumentando a probabilidade de observar interações entre os mesmos, enquanto Pontes et al. (2008) testaram pares de insetos. Este dado aparentemente contraditório pode sugerir que machos de *R. prolixus* podem modificar seu comportamento de acordo com a presença ou ausência de outros machos.

Até o momento, o comportamento sexual dos triatomíneos pode ser atribuído a duas categorias. Por um lado, em *Panstrongylus megistus* as fêmeas são receptivas a cópula somente uma ou poucas vezes durante sua vida adulta (Lima et

al., 1986; Pires et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que esta espécie não apresenta agregação de machos ao redor dos casais em cópula (Pires et al. 2004). Ao contrário, casais em cópula de *R. prolixus* e *T. infestans* são capazes de promover a agregação de machos, favorecendo uma aparente estratégia reprodutiva poliândrica (Baldwin et al., 1971; Manrique & Lazzari, 1995; este trabalho). Além disso, Vitta & Lorenzo (2009), demonstraram que fêmeas de *T. brasiliensis* copulam com vários machos num curto intervalo de tempo e que as APCs realizadas pelos machos desta espécie são frequentemente observadas em grupos de insetos incluindo vários machos.

É importante ressaltar que de acordo com nossos resultados a duração da cópula de *R. prolixus* é a mais longa relatada em triatomíneos. Sugerimos que este fato pode estar relacionado com um comportamento do macho para evitar subseqüentes cópulas da fêmea com outros machos. Além disso, foi observado que os machos agregados tentam copular sucessivamente com a mesma fêmea, entretanto somente duas cópulas com uma mesma fêmea foram observadas (com uma frequência relativamente baixa, 45%). Estas sucessivas cópulas foram observadas somente nas séries nas quais as fêmeas apresentavam as GMs intactas. Desta forma, sugerimos que o sinal de agregação dos machos emitido pelas GMs das fêmeas poderia ter o papel promover a poliandria (Thornhill & Alcock, 1983). Este fato pode indicar um conflito entre a estratégia do macho para garantir a paternidade e a estratégia da fêmea para aumentar a diversidade genética. Entretanto, é necessário desenvolver mais estudos para investigar a possível vantagem de uma cópula múltipla nos triatomíneos, especialmente em relação a diversidade genética da prole (Brasileiro, 1984; Daflon-Teixeira et al., 2009). A poliândria é considerada vantajosa para as fêmeas porque apresenta um efeito

direto no aumento da taxa de produção de ovos e na fertilidade (Arnqvist & Nilsson, 2000).

As fêmeas de *R. prolixus* não apresentaram um comportamento de agregação ao redor de casais em cópula, sugerindo que o comportamento da fêmea não é influenciado pela sua presença, como observado também em *T. infestans* (Manrique & Lazzari, 1995). Entretanto, uma potencial emissão de voláteis pelos machos, influenciando o comportamento sexual das fêmeas ou dos próprios machos, não pode ser descartada. Pontes et al. (2008), demonstraram que machos de *R. prolixus* emitem compostos das GMs, porém com uma frequência menor do que as fêmeas. De fato, no presente trabalho a ausência das secreções das GMs dos machos aparentemente afetou o comportamento sexual dos insetos, induzindo uma diminuição na frequência de cópula, na duração da cópula e das APCs, e excluindo a ocorrência de uma segunda cópula.

A duração das APCs não foi afetada pela ausência dos compostos das GMs das fêmeas. De acordo com Vitta & Lorenzo (2009), o comportamento de APC apresentado pelo macho em *T. brasiliensis* seria uma estratégia do macho para “guardar” a fêmea, evitando que esta copule com outros machos

## 5.5 Considerações finais

Os trabalhos que analisam o comportamento dos insetos desta subfamília não descrevem processos de comunicação entre sexos que medeiam encontros entre machos e fêmeas a longa ou curta distância. Isto é provavelmente devido à falta de estudos que tenham testado tais possibilidades utilizando desenhos experimentais adequados, como por exemplo, olfatômetros ou túneis de vento.

O presente estudo descreveu a dinâmica de uso de abrigos em adultos de *R. prolixus*, evidenciando que a atividade locomotora dos machos é modulada por sinais olfativos sexuais. Analisou-se também o início do voo e a atividade locomotora, considerando a possibilidade de que existissem ativação e orientação nos insetos em resposta a sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto. Além disso, descrevemos a fonte dos odores que promovem a agregação de machos nesta espécie.

Em síntese, os odores emitidos pelas fêmeas são capazes de modular a saída dos machos dos abrigos e aumentar a sua atividade locomotora. Odores secretados pelas GMs de fêmeas promoveram o início do voo de machos de *R. prolixus*, modularam a orientação anemotática observada durante a marcha dos machos. Nossos achados sugerem que na ausência dos odores das GMs de fêmeas, o comportamento de agregação de machos durante a cópula não é expresso. Desta forma, concluímos que os odores produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas desta espécie são de grande relevância no seu comportamento sexual, já que na ausência destes, alguns mecanismos envolvidos na mediação do comportamento sexual são afetados.

Diante destes resultados, ainda se faz necessário avaliar a capacidade de amostras sintéticas dos compostos produzidos pelas GMs para atrair machos em ensaios de olfatométria e/ou túnel de vento. Estudos de eletrofisiologia também serão necessários para descrever o perfil das respostas dos receptores antenais aos diferentes componentes. Estes estudos podem permitir estabelecer perfis de dose-resposta para aqueles compostos das GMs capazes de estimular receptores olfativos. Potencialmente, os compostos biologicamente ativos das GMs poderão ser utilizados na preparação de iscas utilizáveis em associação com armadilhas de captura de adultos de *R. prolixus*. Além disso, feromônios sexuais podem potencialmente servir ao desenho de estratégias de confundimento sexual. Novas ferramentas de controle de vetores poderiam ajudar aos programas destinados a evitar a transmissão da doença de Chagas mediante a eliminação dos insetos vetores, particularmente daquelas espécies que já demonstraram ter desenvolvido resistência a inseticidas.

# Conclusões

---

## 6 Conclusões

- O número de fêmeas que saíram dos abrigos na ausência de estímulos olfativos foi significativamente maior que o de machos.
- Os odores emitidos pelas fêmeas foram capazes de provocar um aumento significativo do número de machos que saem dos abrigos.
- Uma vez fora dos abrigos, a presença de odor de fêmeas provocou um aumento na atividade locomotora dos machos e no número de tentativas de cópula entre eles.
- O número de fêmeas que saíram dos abrigos, assim como sua atividade locomotora, não foi alterado na presença de odor de machos.
- A frequência de início de voo de machos de *R. prolixus* foi significativamente maior na presença de correntes de ar associadas com odor de fêmea.
- Os compostos produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas foram responsáveis pelo aumento da frequência de vôo dos machos.
- Os produtos das glândulas de Brindley de fêmeas não foram necessários para induzir o aumento significativo na frequência de início do vôo mostrado pelos machos desta espécie frente a fêmeas intactas.
- Machos mostraram orientação significativa frente a correntes de ar associadas com odor de fêmea, quando testados no compensador de marcha.
- Os compostos produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas foram responsáveis pela modulação da orientação dos machos no compensador de marcha.

- Os produtos das glândulas metasternais das fêmeas foram necessários para mediar o comportamento de agregação de machos durante a cópula desta espécie.
- Finalmente, a sequência das fases do comportamento de machos que leva ao encontro de uma parceira sexual, inclui diversos componentes de orientação mediados ou modulados por odores das GMs das fêmeas, representando um aspecto até agora praticamente desconhecido da biologia de *R. prolixus*.



# Anexos

---

## **7 Anexos**

### **7.1 Artigo 1**

Claudia A. Zacharias\*, Gina B. Pontes\*, Marcelo G. Lorenzo & Gabriel Manrique.

Flight Initiation by Male *Rhodnius prolixus* is Promoted by Female Odors. J Chem Ecol, 36: 449-451. 2010.

\* contributed equally.

# Flight Initiation by Male *Rhodnius prolixus* is Promoted by Female Odors

Claudia A. Zacharias & Gina B. Pontes & Marcelo G. Lorenzo & Gabriel Manrique

Received: 10 August 2009 / Revised: 26 February 2010 / Accepted: 19 March 2010 / Published online: 30 March 2010  
# Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** Several triatomine bug species utilize chemical cues for sexual communication. We tested whether female or male *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease, produce volatile chemicals that elicit flight responses from conspecifics, and then isolated the source of the chemical. Males confronted with an airstream containing female odors showed a significantly greater take-off frequency compared to a blank airstream or an airstream with male odors. In contrast, females exhibited similar take-off frequencies to male or female odor as to a clean airstream. Occlusion of female metasternal glands with paraffin wax resulted in a significant decrease in male take-off frequency compared to that of intact females. Additionally, excised female metasternal glands elicited a similar take-off frequency from males as did intact females, both significantly greater than the take-off frequency to clean air. These results show that *R. prolixus* females release a pheromone from their metasternal glands that causes upwind flight in conspecific males.

**Key Words** *Rhodnius prolixus* · Flight · Sexual behavior · Communication · Metasternal glands · Pheromones · Chagas disease · *Trypanosoma* · Hemiptera · Reduviidae · Triatominae

---

Claudia A. Zacharias and Gina B. Pontes contributed equally.

C. A. Zacharias · G. Manrique (\*)  
Laboratorio de Fisiología de Insectos, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, C1428EHA Buenos Aires, Argentina  
e-mail: gabo@bg.fcen.uba.ar

G. B. Pontes · M. G. Lorenzo  
Laboratory of Triatomines and Chagas Disease Epidemiology, René Rachou Institute/FIOCRUZ, 30190002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## Introduction

*Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae: subfamily Triatominae) transmits *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, in northern South America and parts of Central America. In Latin America, Chagas disease afflicts 15 million people, with roughly a further 90 million at risk from potential transmission.

Triatomines are capable of sustained flight, dispersing over considerable distances (Gringorten and Friend 1979; Schweigmann et al. 1988). Flight is influenced by temperature and nutritional state of the insect (Lehane et al. 1992; Gurevitz et al. 2006). Adults are attracted strongly to light sources (Noireau and Dujardin 2001; Minoli and Lazzari 2006).

It is known that male triatomine bugs are attracted to and aggregate around mating pairs of adults (Baldwin et al. 1971; Manrique and Lazzari 1995). Triatomine bugs have paired Brindley's BGs and metasternal glands (MGs) that emit volatile compounds. The compounds emitted from the MGs, in particular, appear to mediate triatomine sexual communication (Crespo and Manrique 2007; Pontes et al. 2008). Pontes et al. (2008) demonstrated that female *R. prolixus* emit MG odors at dusk and in greater quantities than males.

We evaluated whether male or female odor added to an airstream promotes an increase in flight initiation or oriented take-off in adult *R. prolixus*. Also, we demonstrated that the source of the odor responsible for this effect are the female MGs.

## Methods and Materials

*Rhodnius prolixus* were obtained from the Servicio Nacional de Chagas, Argentina, and reared in the laboratory

at  $26\pm 1^\circ\text{C}$ , 30–50% RH, 12:12 h L:D, with live hens as a blood meal source. Hens were handled according to the biosafety rules from the Servicio de Higiene y Seguridad, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Bugs were sexed before final ecdysis, and the two sexes were kept separately until use. One to 2-months-old virgin adults, starved for  $20\pm 5$  d, were used in the experiments.

We used a cage constructed of voile fabric (based on Minoli and Lazzari 2006), with a circular acrylic arena (15 cm diam.  $\times$  5 cm high) hung 1 m above the center of the floor. A vertical wooden rod (1.5 cm diam.  $\times$  15 cm high), fixed in the center of the arena, functioned as a platform for flight take-off. Bug movement was recorded with an infrared video camera (Videoman, JCC-300, Korea), with an infrared LED light source illuminating the platform. The video monitor was divided into eight  $45^\circ$  sectors, centered on the image of the top of the take-off platform, allowing determination of the angular direction of take-off. A Vaseline® film, applied to the interior surface, allowed only flying insects to leave the arena. A fan fixed inside an 85-cm-long PVC tube (12 cm i.d.) generated an airstream of  $12\pm 0.9$  cm  $\text{sec}^{-1}$  (measured with a Testo 405-V1 anemometer, Germany) at the take-off platform. Insects used as odor sources were placed inside mesh-covered, open-ended flasks that permitted airflow. Groups of 20 males or females (four replicates per treatment) were released onto the arena at the start of the scotophase and left for 8 hr. We recorded the number of take-offs and their angular direction.

In the first experiment, we tested the responses of males and females, separately, to: a) clean air, b) air with odors from females, and c) air with odors from males. Ten insects per flask were used in all treatments using insects as odor sources. Next, we occluded the orifices of female glands with paraffin wax (Crespo and Manrique 2007) 24 hr prior to testing the responses of males to the following treatments: a) BG-occluded females, b) MG-occluded females, c) MG- and BG-occluded females, and d) sham females that had wax applied between the prosternum and metasternum that did not occlude the glands. Finally the take-off frequency and orientation of males was also tested to airstreams with: a) excised female MGs (ten glands), b) intact females, and c) control consisting of ten pieces of tissue and cuticle from the coxae of the first legs of females.

Take-off frequency data were analyzed by linear parametric statistics, after normality (P-Plot) and homoscedasticity (Levene's test) were verified. A two-way ANOVA, assuming fixed factors (gender and stimulus type), or a one-way ANOVA was applied, as appropriate. A significant ANOVA was followed by a post-hoc comparison (Tukey test). The MGs odor data set did not meet normality assumptions; therefore, data were log-transformed. Take-off

frequencies presented in the results section are means ( $\pm$ SEM) from four replicates.

## Results and Discussion

Typically, responsive insects climbed the take-off platform, moved their antennae, and took flight. There was a significant interaction (two-way ANOVA,  $F_{2,18}=12.63$ ,  $P<0.001$ ) between gender and stimulus type, indicating that males and females responded differently to stimuli. Male take-off frequency varied with stimulus (Simple effect,  $F_{2,18}=11.94$ ,  $P<0.001$ ), with the greatest response being to female odor. There were no significant differences in responses of females to any of the odor treatments (Fig. 1a).

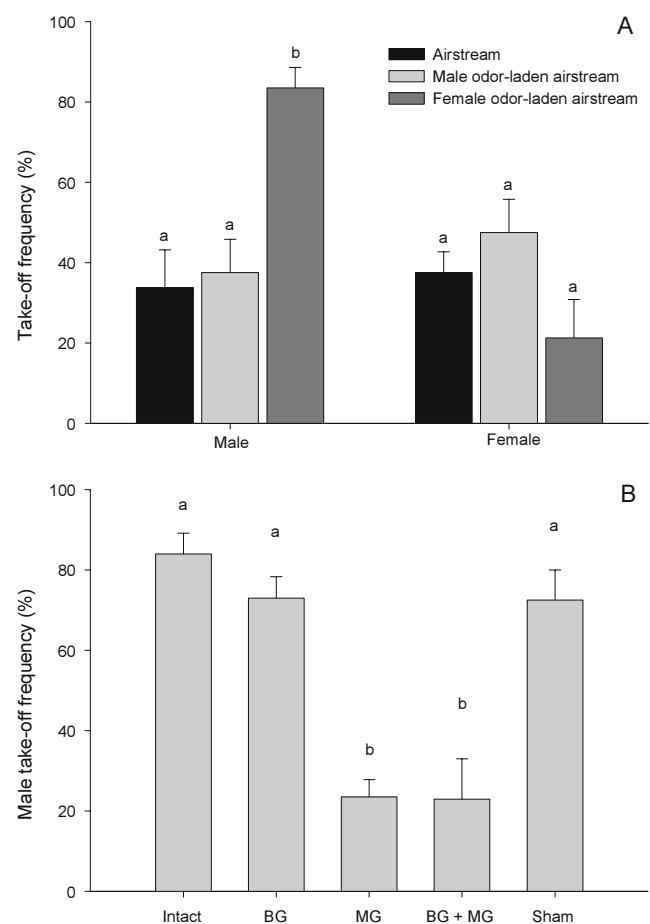


Fig. 1 Take-off frequencies (mean $\pm$ SEM) of: a) *Rhodnius prolixus* males or females to airstreams with intact males, intact females or clean air (control), and b) *R. prolixus* males to various odor-laden airstreams; Intact = intact females, BG = females with Brindley glands occluded with paraffin wax, MG = females with metasternal glands occluded, MG+BG = females with metasternal and Brindley glands occluded, Sham = females that had paraffin applied to the cuticle without occluding any glands. Different letters atop bars denote statistically different means (Tukey,  $P<0.05$ ). Each treatment consisted of four replicates

In the second experiment, flight frequencies showed a significant (one-way ANOVA,  $F_{(4,15)} = 19.95$ ,  $P < 0.001$ ) effect of occlusion treatment, with females with occluded MG or MG+BG eliciting significantly lower ( $P < 0.05$ ) take-off responses from males than did intact, sham-operated, or BG-occluded, females (these three treatments elicited similar take-off frequencies; Fig. 1b). In the final experiment, male take-off frequency was different depending on treatment (one-way ANOVA,  $F_{(2,9)} = 13.75$ ,  $P = 0.002$ ). Excised glands elicited a similar take-off frequency as intact females ( $60 \pm 7\%$  vs.  $84 \pm 5\%$ ;  $P > 0.05$ , Tukey test). However, odors from control tissues elicited a lower male take-off frequency compared to odors from intact females ( $64 \pm 7\%$  vs.  $84 \pm 5\%$ ;  $P < 0.05$ ) or from excised MGs ( $64 \pm 7\%$  vs.  $60 \pm 7\%$ ;  $P < 0.05$ , Tukey test).

The take-off direction of insects had a non-uniform distribution for all treatments tested. Insects tended to orient toward the direction of the airstream, regardless of odor.

The present work demonstrates that the flight of adult male *R. prolixus* can be triggered by volatile chemical cues released by conspecific females. In contrast, females did not show significant flight responses to male chemical cues. The source of the volatiles that elicit male flight appear to be the MGs of females, because when this gland was occluded with paraffin wax, the flight responses of males decreased significantly. In contrast, occlusion of another gland of females, the BG, or sham operation, did not affect flight responses of males. This sex-specific response suggests that this behavior is part of a mate location mechanism involving a sex pheromone emitted by females (Pontes et al. 2008).

Now that we have established that female *R. prolixus* produce a pheromone that elicits flight from males, chemical identification can proceed. Indeed, the chemical ( $\epsilon$ ) may already have been identified in the study of Pontes et al. (2008). Identification of the pheromone will allow us to determine whether male behavior can be manipulated for controlling vectors of Chagas disease.

**Acknowledgements** The authors are grateful to Dr. Gerardo Cueto for his support with the statistical analysis. Thanks also to Ms. Emma Weeks (Rothamsted Research/London School of Hygiene and Tropical Medicine) for editing an earlier version of the manuscript. This work was supported by grants from CONICET, UBA, the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01191 to GM), CAPES-MinCyT, FAPEMIG, Molecular Entomology INCT and FIOCRUZ.

## References

- BALDWIN, W. F., KNIGHT, A. G., and LYNN, K. R. 1971. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Ent.* 103:18–22.
- CRESPO, J. G. and MANRIQUE, G. 2007. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. *J. Insect Physiol.* 53(7):708–714.
- GRINGORTEN, J. L. and FRIEND, W. G. 1979. Wing-beat pattern in *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae) during exhaustive flight. *Can. J. Zool.* 57:391–395.
- GUREVITZ, J. M., CEVALLOS, L. A., KITRON, U., and GÜRTLER, R. E. 2006. Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. *J. Med. Entomol.* 43:143–150.
- LEHANE, M. J., MCEWEN, P. K., WHITAKER, C. J., and SCHOFIELD, C. J. 1992. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 52:27–38.
- MANRIQUE, G. and LAZZARI, C. R. 1995. Existence of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I. Behavioural Evidence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90:645–648.
- MINOLI, S. A. and LAZZARI, C. R. 2006. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Trop.* 97:324–330.
- NOIREAU, F. and DUJARDIN, J. P. 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:385–389.
- PONTES, G. B., BOHMAN, B., UNELIUS, C. R., and LORENZO, M. G. 2008. Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Chem. Ecol.* 34:450–457.
- SCHWEIGMANN, N., VALLVE, S., MUSCIO, O., GHILLINI, M., ALBERTI, A., and WISNIVESKY-COLLI, C. 1988. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 2:401–404.

## **7.2 Artigo 2**

Gina B. Pontes, Marcelo G. Lorenzo. Female Metasternal Gland Odors Mediate Male Aggregation In *Rhodnius Prolixus*. *Submitted in Medical and Veterinary Entomology*.

# **Female metasternal gland odors mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus***

GINA B. PONTES<sup>a\*</sup> and MARCELO G. LORENZO<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, Caixa Postal 1743, CEP 30.190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3371 7806; fax: + 55 31 3295 3115

E-mail address: gina@cpqrr.fiocruz.br

**Abstract.** We investigated whether metasternal gland (MG) products mediate male aggregation during mating in *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). In laboratory assays, we investigated whether of the selective occlusion of female MGs hampered male aggregation around mating pairs. Control assays without gland occlusion were performed. Pairs of insects presenting intact MGs mated and other males aggregated around them confirming conclusions from previous studies. However, when female MGs were occluded, males did not aggregate. Conversely, the occlusion of male MGs did not affect aggregation of males. Our experiments demonstrated that the products emitted by the MGs of a mating *R. prolixus* female induce other males to aggregate around the mating pair. Aggregation behavior of males likely result from the eventual release of volatiles from the female's metasternal glands. We reinforce the hypothesis suggesting that the compounds produced by the MGs of *R. prolixus* act as sexual communication signals for this species.

**Key words:** Sexual aggregation, metasternal glands, *Rhodnius prolixus*, Chagas disease.

## Introduction

Chagas disease is a chronic parasitic illness resulting from the infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2005). *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae) is the main vector of this parasite to humans in Northern South America and Central America (Schofield, 1994). In these regions, it is found infesting unplastered adobe walls and palm roofs of rural houses (Monteiro *et al.*, 2003). Adult triatomines have two pairs of exocrine glands, the metasternal glands (MGs) located in the ventral metathorax and Brindley's glands (BGs) located in the abdomen and whose ducts open in the dorsolateral metathorax (Brindley, 1930). MG and BG are absent in nymphs and this subfamily appears to have no other odor-producing glands, such as the abdominal and ventral glands found in other Reduviidae (Kalin & Barret, 1975; Schofield, 1979; Rossiter & Staddon, 1983).

Manrique *et al.* (2006), Pontes *et al.* (2008) and Vitta *et al.* (2009) identified the compounds produced by the MG of *T. infestans*, *R. prolixus* and *Triatoma brasiliensis*, respectively. In all cases, the complex mixtures described included ketones and alcohols. Moreover, Manrique *et al.* (2006) and Pontes *et al.* (2008) detected that *T. infestans* and *R. prolixus* released compounds produced by the MGs during copulation, suggesting the involvement of the secretion of these glands in the sexual context. Additionally, Pontes *et al.* (2008) showed that females emit MG products fundamentally at night, when these insects are most active.

The mating of several species of triatomines have been studied under laboratory conditions by several authors (Rojas *et al.*, 1990; Rojas & Cruz-López, 1992; Manrique & Lazzari, 1994, 1995; García-Pérez *et al.*, 1997), showing that these insects have a rather simple sexual behavior. Baldwin *et al.* (1971) showed that during the copulation of *R. prolixus*, a volatile signal is released and promotes an aggregation of males around



mating couples. Manrique & Lazzari (1995) described a similar process of male aggregation to mating pairs in *T. infestans*. Recently, Crespo & Manrique (2007) demonstrated that copulation and the aggregation behavior of males likely result from the eventual release of volatiles from the MGs of females. Vitta & Lorenzo (2009) demonstrated that copulation is prolonged when *T. brasiliensis* pairs mate in the presence of other males. Besides, these authors showed that males perform long postcopulatory associations only in the presence of other males, apparently as a mate guarding response to the presence of potential competitors. In all three species, females can copulate with several males in a short time (Baldwin *et al.*, 1971; Manrique & Lazzari, 1995; Vitta *et al.*, 2009; this report). Therefore, several triatomine species present a chemically mediated polyandric mating system, but the chemical signals mediating this behavior, as well as their source, need to be determined in most cases.

In this study, we tested whether female MG products mediate aggregation to mating pairs by male *R. prolixus*. This was performed through the selective occlusion of female or male glands and subsequent analysis of the behavior of the insects. Additionally, we examined whether the absence/presence of MG products of both genders affect the occurrence of mating, mating duration, postcopulatory associations and the occurrence of successive mating.

## **Materials and Methods**

### *Insects*

*Rhodnius prolixus* bugs used for experiments were reared in the Laboratory of Triatomines and Epidemiology of Chagas Disease, Oswaldo Cruz Foundation from a colony initiated with field insects from Honduras. Insects were reared at  $26 \pm 1$  °C,  $65 \pm$

10% RH, a 12:12 LL/DD illumination regime and fed twice a month *in vivo* on hen blood, adjusting the protocol according to institutional animal welfare regulations (FIOCRUZ Committee on Animal Welfare license L-058/08). To standardize insects for experiments, fifth instar larvae were sorted by sex before their imaginal ecdysis (Espínola, 1966). Twenty-day old virgin adults, which had been starved for 10 days, were used for the experiments.

*Rhodnius prolixus* adults were tested in groups of five insects, e.g., one female and four males, in order to generate conditions that could induce aggregation during mating. We used the following treatments to evaluate the basis of male aggregation during mating: a) 4 males and 1 female, b) 4 males and 1 female whose MG orifices were occluded, c) 4 males and 1 sham treated female, d) 4 males with occluded MGs and 1 female, e) 4 females and 1 male, f) 4 males and 1 marked male.

#### *Experimental design*

Assays were started when 4 insects of the same gender were released in the center of a circular arena (10 cm height X 25 cm diameter) that had the substrate lined with filter paper. After 15 minutes, a female or a marked male (dot of white acrylic ink) were also released. In order to avoid mechanical disturbance (Manrique *et al.*, 2006), each individual was handled carefully with the aid of a piece of filter paper and, as it climbed on the paper, immediately transferred to the arena. In all cases, mating behavior was recorded for 90 minutes. The behavior of insects was recorded by a video camera located above the experimental arena. In assays in which MG occlusion occurred, it was performed by means of a micro cauterizer (Wax Pen, Hot Pen, Washington, USA) that allowed applying melted paraffin wax to block gland orifices (Sigma-Aldrich, melting point 58-62 °C). All tests were performed at the beginning of the scotophase.

## *Data analysis*

We defined a practical criterion to quantify aggregation around mating pairs. For this, we counted the number of insects present inside a virtual circle of 5 cm diameter centered over the female or the marked male. The experimental arena had an area of 490 cm<sup>2</sup>, while the circle presented a 20 cm<sup>2</sup> area, which corresponded to 4% of the experimental arena. Other parameters analyzed were: 1) mating frequency, 2) duration of copulation, 3) duration of postcopulatory associations (PAs, Vitta & Lorenzo, 2009), and 4) the occurrence of a second mating. To evaluate the degree of aggregation, the number of insects present inside the circle was recorded every five minutes after the start of copulation. By means of video playback we also recorded the number of insects inside the circle a minute before mating started and at its start. Every copulation was evaluated until it ended, however in order to homogenize our data (due to the fact that mating duration varies), we determined a cut-off time of 40 minutes. To avoid variation in our criterion for quantifying aggregation, the center of the circle was always superimposed on to the pronotum of the reference insect. Moreover, insects were considered to be inside the circle whenever more than half of their body was inside it.

To verify the existence of aggregation in the groups was performed a 2x2 frequency table, followed by a Chi-square test. The categories analyzed were grouped in two variables. The first variable compared occurrence of aggregation (4M/1F, 4M/1Fsham, 4MMG/1F) vs non-aggregation (4M/1M, 4M/FMG, 4F/1M). The second variable compared the number of insects grouped (0-1, > 1). The Shapiro-Wilk test was applied to check whether our datasets presented a normal distribution. A partitioning Chi-square test was used to analyze mating frequency. Mating duration in different treatments was compared by means of a one way ANOVA. The analysis of the duration

of postcopulatory associations (PAs) was performed by means of a Kruskal-Wallis test. We defined an alfa level of 0.05 for assessing statistical significance in all tests.

## Results

When 4 males with an intact female were tested together, males exhibited a tendency to aggregate close to the mating pair (Fig. 1A). A similar behavior was not observed when 4 females were tested with a male, i.e., the number of females around the mating pair remained low and unchanged after mating initiated (Fig. 1 F). Similarly, we did not observe a tendency for spontaneous male aggregation in the absence of mating pairs (Fig. 1E). To evaluate whether MG products could be the chemical signal that promotes male aggregation around mating pairs, the orifices of female MGs were occluded with paraffin wax. Male aggregation was not observed in the absence of female MGs odors (Fig. 1B). Applying paraffin to females without occluding MG orifices, i.e., using *sham* treated females, did not affect the aggregation of males around mating pairs (Fig. 1C). Besides, occluding male MG orifices did not affect aggregation around mating pairs (Fig. 1D). Accordingly, the results presented this experiment demonstrated the existence of aggregation in the following groups studied: 4M/1F, 4M/1Fsham, 4MMG/1F (Chi-square test = 31.45,  $p < 0.0001$ ).

The frequency of copulation varied among the groups tested (Table 1). When 4 males and 1 female were tested, twelve copulatory attempts were performed by males, of which 9 resulted in successful copulations (75%). When assays were carried out with 4 females and 1 male, 11 copulation attempts resulting in 9 successful copulations were observed (81.8%). However, when 4 males and 1 female with occluded MGs were tested, a ratio of 6 copulations to 22 attempts (27.27%) was recorded, i.e., the mating success in this series was significantly lower (Chi-square,  $P < 0.0005$ ). Additionally, when 4

intact males were released with a *sham* treated female, the observed ratio was 9 out of 11 (81.8%). Finally, when 4 males with occluded MGs were released with an intact female, this ratio was intermediate (6 / 11, 54.5%).

The mean duration of copulation was not significantly different between treatments, 4 males and 1 female ( $40.2 \pm 6.5$  min) , 4 females and 1 male ( $34.6 \pm 3.6$  min), 4 males and 1 *sham* treated female ( $37.9 \pm 3.5$  min), 4 males with occluded MGs and 1 female ( $37 \pm 4.7$ min), 4 males and 1 female with occluded MGs. In the series performed with 4 males and 1 female with occluded GMs mating duration was lower ( $20.5 \pm 4.7$  min). However, this difference was not significant (ANOVA,  $p = 0.07$ ) (Table 1).

The duration of post-copulatory associations (PAs, i.e., the time that the male remained on top of the female after separation of the aedeagus from the female genitalia) was another parameter evaluated in our study. We could not observe significant differences in the duration of PAs between the different treatments (Table 1, Kruskal-Wallis test,  $p = 0.18$ ). Nevertheless, a tendency of decreased PA duration could be observed in the absence of male MG volatiles.

Finally, the occurrence of a second mating was only observed when 4 males and 1 female or 4 males and 1 *sham* female were grouped. In fact, a maximum of two matings by the same female was observed in 4 trials in both series (4/9, 45% copulas). It is worth mentioning that in these two treatments no male aggregation was observed as a response to the second mating (Table 1).

As we never observed more than one copulation when 4 females and one male were grouped, 4 additional trials were performed to verify whether males were capable of re-mating in a 24 hr interval and second copulations were not observed.

## **Discussion**

Our results confirm that an aggregation signal is emitted during mating in *R. prolixus*, as reported by Baldwin *et al.* (1971). This emission induces neighboring males, but not females, to aggregate around mating pairs. Furthermore, we demonstrate here that female MGs have an important role in mediating the sexual behavior of these insects, since, when occluded, the proportion of mating pairs and the aggregation of males were affected (Fig. 1B). On the contrary, in the experiments in which females had fully functional MGs, a high proportion of pairs mated and males aggregated around them (Fig. 1A and 1C). Therefore, copulation and male aggregation behavior appear to depend on the release of volatile compounds from the MGs of females. These results are consistent with the recent demonstration that MG compounds are released by copulating pairs of *T. infestans* and *R. prolixus* (Manrique *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2008). In addition, the latter demonstrated that compounds produced by MGs are emitted by virgin females during the dark phase of their daily cycle and showed that the independent occlusion of the MGs of males or females induces a reduction in mating success. These authors suggested that sexual recognition between individuals of both sexes may be, at least partially, mediated by male and female MG odors. In the present report a significant decrease in mating frequency was only observed in the absence female MG odors, but not with male ones. This inconsistency may be due to the fact that the experiments reported here were performed with groups of five triatomines, increasing the probability of observing interactions between insects, while Pontes *et al.* (2008) tested insect pairs. This apparent contradiction may suggest that *R. prolixus* males modify their behavior according to the presence or absence of other males.

To date, reports indicate that the sexual behavior of triatomines can be ascribed to two categories. In one side, *Panstrongylus megistus* females are receptive to copulation only once or very few times during their adult lifespan (Lima *et al.*, 1986;

Pires *et al.*, 2004). Moreover, *P. megistus* do not present male aggregation in response to mating pairs (Pires *et al.*, 2004). In contrast, mating pairs of *R. prolixus* and *T. infestans* promote male aggregations and an apparent polyandric reproductive strategy (Baldwin *et al.*, 1971; Manrique & Lazzari, 1995; this report). This may also be the case for *T. brasiliensis*, as Vitta & Lorenzo (2009) showed that females of this species copulate with several males in short intervals and PAs displayed by males are frequently observed when insects are studied in groups that include several males. Interestingly, according to our results mating in *R. prolixus* pairs has the longest duration reported for triatomines. We suggest that this may be due to male behavior intended to avoid subsequent copulations by females. Indeed, our experiments showed that aggregated males try to copulate successively with the same female and two successive mating events could only be seen with females having functional MGs (Table 1). Thus, the male aggregation signal emitted by female MGs could be related to promoting polyandrous mating (Thornhill & Alcock, 1983). This may indicate a conflict between the male strategy for ensuring paternity and the female strategy to increase the number of offspring. The possible advantage of multiple mating in triatomines deserves further analysis, especially in relation to offspring genetic diversity (Brasileiro, 1984; Daflon-Teixeira *et al.*, 2009) Polyandry is regarded as advantageous for females because of direct effects such as increased rate of egg production and fertility (Arnqvist & Nilsson, 2000).

*R. prolixus* females were not observed to aggregate around mating pairs, showing that female behavior is not influenced by their presence, as seen with *T. infestans* (Manrique & Lazzari, 1995). However, the potential emission of male volatiles influencing female or male sexual behavior cannot be discarded, as *R. prolixus* males emit MG volatiles, even though with lower intensity than females (Pontes *et al.*,



2008). In fact, blocking male MGs slightly affected mating behavior, inducing a decrease in mating frequency, a shorter duration of copulation and PAs and, excluding the occurrence of a second mating.

The duration of PAs not was affected by the absence of female MG compounds. According to Vitta & Lorenzo (2009), male postcopulatory associations in *T. brasiliensis* are a form of mate guarding geared toward impeding subsequent males to copulate with the female. Whether the absence of male MG volatiles induces a relevant change in PA duration by *R. prolixus* males deserves new experimental approaches to unveil if PAs are expressed as a response to male MG signals (Table 1).

## Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG, FIOCRUZ and INCT de Entomologia Molecular-CNPq for financial support. G.B. Pontes acknowledges CPqRR for granting a scholarship during her doctoral studies. The authors are grateful to Dr. Bonaventure Aman Omondi for kindly editing the manuscript.

## References

- Arnqvist, G. & Nilsson, T. (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, **60**, 145-164.
- Baldwin, W.F., Knight, A.G. & Lyn, K.R. (1971) A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Entomologist*, **10**, 18-22.
- Brasileiro, V.L.F. (1984) Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). II- Influencia da cópula e da nutrição. *Revista Brasileira de Entomologia*, **28**, 441-449.
- Brindley, M.D.H. (1930) On the metasternal scents-glands of certain Heteroptera. *Transactions of the Entomological Society of London*, **78**, 199-208.
- Crespo, J.G. & Manrique, G. (2007) Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. *Journal of Insect Physiology*, **53**, 708-714.
- Daflon-Teixeira, N.F., Carvalho-Costa, F.A., Chiang, R.G. & Lima, M.M. (2009) Influence of blood meal and mating in reproduction patterns of *Triatoma brasiliensis*

females (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**, 1031-1034.

Espínola, H.N. (1966) Nota sobre diferenças sexuais em formas imaturas de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **26**, 263-267.

García-Pérez, J., Blanco-Pinon, A. & Navarro-Fernandez, E. (1997) Comportamiento sexual de *Triatoma gerstaeckeri* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Zoológica Mexicana*, **70**, 55-63.

Kalin, M. & Barret, F.M. (1975) Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Annals of the Entomological Society of America*, **68**, 126-134.

Lima, M.M., Jurberg, P. & de Almeida, J.R. (1986) Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. II. Influence of feeding, lighting and time of day on the number of matings, mating speed and duration of copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **81**, 381-388.

Manrique, G. & Lazzari, C.R. (1994). Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**, 629-633.

Manrique, G. & Lazzari, C.R. (1995). Existence of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae):I. Behavioural evidence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **90**, 645-648.

Manrique, G., Vitta, A.C., Ferreira, R.A., Zani, C.L., Unelius, C.R., Lazzari, C.R., Diotaiuti, L. & Lorenzo, M.G. (2006) Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology*, **32**, 2035-2052.

Monteiro, F.A., Barrett, T.V., Fitzpatrick, S., Cordon-Rosales, C., Feliciangeli, D. & Beard, C.B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*, **12**, 997-1006.

Pires, H.H.R., Lorenzo, M.G., Lazzari, C.R., Diotaiuti, L. & Manrique, G. (2004) The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae): an experimental study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 295-300.

Pontes, G.B., Bohman, B., Unelius, C.R. & Lorenzo, M.G. (2008) Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Chemical Ecology*, **34**, 450-457.

Rojas, J.C. & Cruz-López, L. (1992) Sexual behaviour in two species of *Triatoma phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, **29**, 13-18.

Rojas, J.C., Malo, E.A., Martínez-Gutiérrez, A. & Ondarza, R.N. (1990) Mating behavior of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae) Usinger. *Annals of the Entomological Society of America*, **83**, 598-602.

Rossiter, M. & Staddon, B.W. (1983) 3-Methyl-2-hexanone from the triatominae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera: Reduviidae). *Experientia*, **39**, 380-381.

Schofield, C.J. (1979) The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bulletin of Entomological Research*, **69**, 363-379.

Schofield, C.J. (1994) Triatominae, biología y control. United Kingdom: Eurocommunica Publications, 79p.

Thornhill, R. & Alcock, J. (1983) The evolution of insect mating systems. Harvard University Press- Cambridge, USA. 547p.

Vitta, A.C.R., Bohman, B., Unelius, C.R. & Lorenzo, M.G. (2009) Behavioral and electrophysiological responses of *Triatoma brasiliensis* males to volatiles produced in the metasternal glands of females. *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 1212-1221.

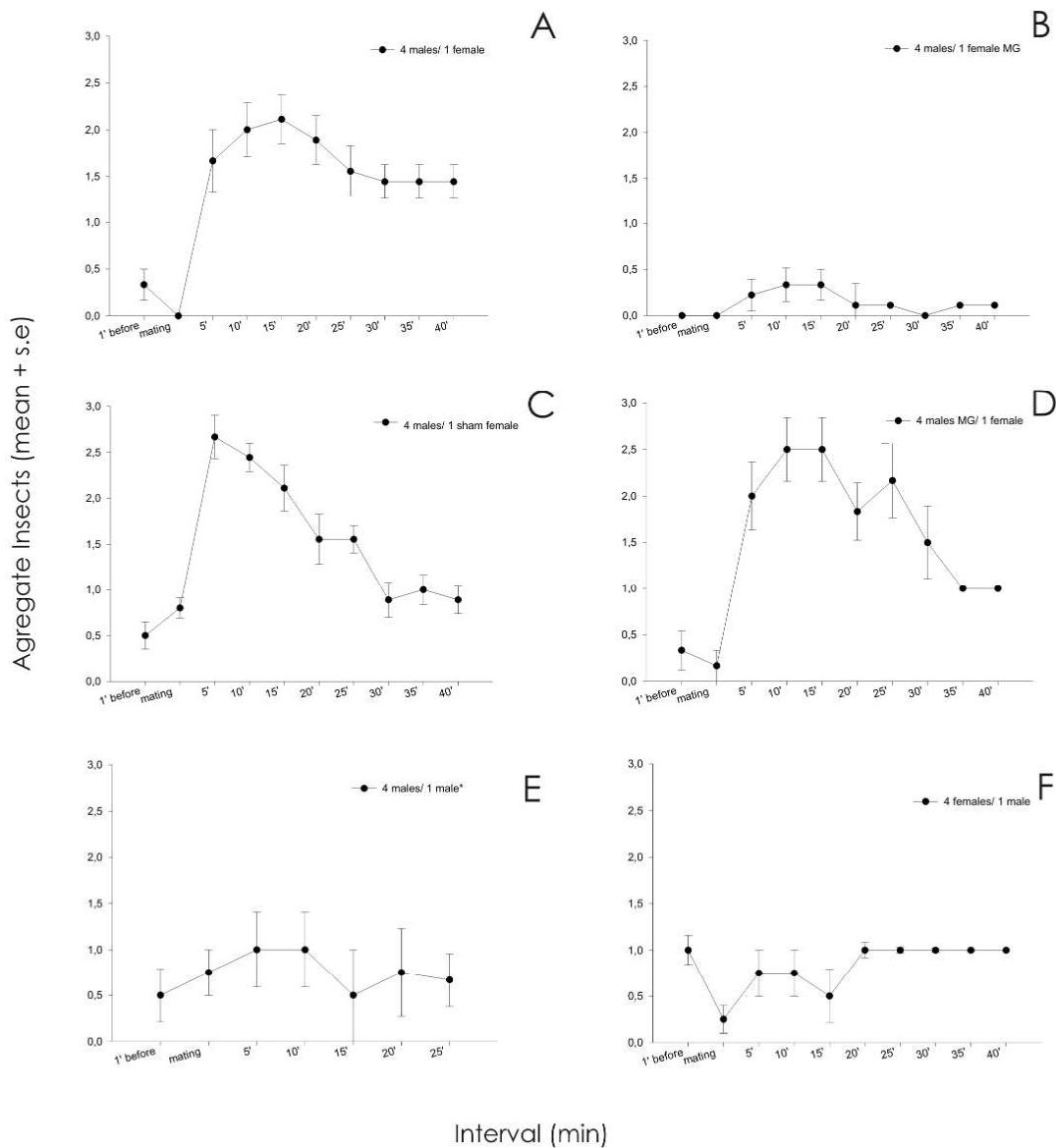
Vitta, A.C.R. & Lorenzo, M.G. (2009). Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, **46**, 789-795.

WHO (World Health Organisation) (2005) UNDP/ World Bank/ WHO special programme for research and training in tropical diseases. World Health Organisation, Geneva.

**Table 1.** Female MG odors affect mating behavior and male aggregation in *Rhodnius prolixus*

Experimental group	N	Copulation frequency	Duration of copulation (min)	Post mating association (min)	Second copulation (%)
4M/1F	9	9/12 (75%) <sup>a</sup>	40.2 ± 6.5 <sup>a</sup>	6.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	45
4F/1M	9	9/11 (81.8%) <sup>a</sup>	34.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	4.6 ± 1 <sup>a</sup>	-
4M/1M*	9	-	-	-	-
4M/1F MG	6	6/22 (27.27%) <sup>b</sup>	37.9 ± 3.5 <sup>a</sup>	-	-
4M/1F sham	9	9/11 (81.8%) <sup>a</sup>	37 ± 4.7 <sup>a</sup>	4.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	45
4MMG/1F	6	6/11 (54.5%) <sup>a</sup>	20.5 ± 4.7 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	-

4M/1F = 4 males and 1 female, 4F/1M = 4 females and 1 male, 4M/1M\* = 4 males and 1 marked male, 4M/1F MG = 4 males and 1 female with MG orifices occluded with paraffin, 4M/1F sham = 4 males and 1 female treated with paraffin, but female MG orifices not occluded, and 4MMG/1F = 4 males with MGs orifices occluded with paraffin and 1 female. Different letters denote significant statistical differences.



**Fig. 1.** Mean number of aggregated insects as a function of time: (A) 1 female and 4 males, (B) 1 female with occluded MGs and 4 males, (C) 1 sham treated female and 4 males, (D) 4 males with occluded MGs and 1 female, (E) 4 males and 1 marked male and, (F) 4 females and 1 male. Existence of aggregation in the following groups studied: 4Males/1Female (A), 4Males/1Female sham (B), 4Males MG/1Female (D) (Chi-square test = 31.45,  $p < 0.0001$ ).





# Referencias Bibliográficas

---

## 8 Referências Bibliográficas

Alcock J. Post insemination association between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annu Rev Entomol* 1994; 39: 1-21.

Arnqvist G, Nilsson T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim Behav* 2000; 60: 145-164.

Baldwin WF, Knight AG, Lynn KR. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can Entomol* 1971; 103:1822.

Barrozo RB, Manrique G, Lazzari CR. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemipetra: Reduviidae). *J Insect Physiol* 2003; 49:315-321.

Barrozo RB, Lazzari CR. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem Senses* 2004a; 29:319-329.

Barrozo RB, Lazzari CR. Orientation behaviour of the bloodsucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chem Senses* 2004b; 29: 833-841.

Barrozo RB, Schilman PE, Minoli SA, Lazzari CR. Daily rhythms in disease-vector insects. *Biol Rhythm Research* 2004; 35: 79-92.

Barrozo RB, Minoli SA, Lazzari CR. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J Insect Physiol* 2004; 50: 249-254.

Bento JM. Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-pragas. In: Vilela E.F., Della Lucia T.M.C., editores. *Feromônios de Insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas*, 2° edição. Viçosa, Minas Gerais, 2001. P 70-87.

Bérenger JM, Blanchet D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(6): 733-736.

Blum MS. Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Ann. Rev Entomol* 1996; 41: 353-74.

Bodin A, Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 2008; 54:1343-1348.

Brasileiro VLF. Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera - Reduviidae). II- Influência da cópula e da nutrição. Rev Bras Entomol 1984; 28: 441-449.

Brindley MD. On the metasternal scents-glands of certain Heteroptera. Trans Ent Soc Lond 1930; 78:199-208.

Carbajal De La Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo MG. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. Acta Trop 2007; 101: 115-119.

Cardé RT, Bell WJ. Chemical ecology of insects 2. In: Chapman & Hall, editors. The Insects: Structure and Function. New York, 1995, p 443-447.

Cardé RT, Elkinton JS. Field trapping with attractants: methods and interpretation, In: Hummel HE, Miller TA, eds. Techniques in pheromone research. Springer-Verlag. New York, 1984. p 111-129.

Cardé RT, Minks AK. Insect pheromone research: new directions. In: Chapman & Hall, eds. The Insects: Structure and Function, New York, 1997. p 684-690.

Ceballos LA, Vazquez-Prokopec GM, Cecere MC, Marcet PL, Gurtler RE. Feeding rates nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. Acta Trop 2005; 95: 149-59.

Chagas, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1: 528.

Chapman RF. The insects: structure and function. 4 edition. Cambridge University Press, UK. 1998.

Costa J, Argolo AM, Felix M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 2006, 1385: 47-52.

Costa J, Felix M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2007, 102(1): 87-90.

Crespo JG, Manrique G. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. J Insect Physiol 2007; 53(7):708-714.

Cruz-López L, Malo EA, Rojas JC. Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88:535-539.

Cruz López L, Morgan ED, Ondarza RN. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. Med. Vet. Entomol 1995. 9:403-406.

Cruz-López L, Malo EA, Rojas, JC, Morgan ED. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med Vet Entomol* 2001; 15: 351-357.

De Brito Sánchez MG, Manrique G, Lazzari CR. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) II. Electrophysiological correlates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90: 649651.

Dias JCP. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today* 1987; 3: 336-341.

Eberhard WG. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1996.

Espínola, HN. Aspectos do Comportamento do *Triatoma infestans* (Klug, 1834) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais– UFMG, Brasil. 1973.

Fontan A, Audino PG, Martinez A, Alzogaray RA, Zerba EN, Campos F, Cork A (). Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease: chemical analysis and behavioral bioassay. *J Med Entomol* 2002. 39:191-197.

Forero D, Weirauch C, Baena M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa* 2004; 670: 1-12

Friend WG, Smith JJB. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J Insect Physiol* 1985; 17:233-243.

Games DE, Schofield CJ, Staddon BW. The secretion from Brindley's scent gland in Triatominae. *Ann Soc Ent Am* 1974, 67: 820-826.

Galvão C, Carvalho R, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 2003; 202:1-36.

Gamboa, C.J. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliado en Venezuela. *Bol Ofic Sanit Pan* 1963; 54, 18-25.

García-Pérez J, Blanco-Pinon A, Navarro-Fernandez E. Comportamiento sexual de *Triatoma gerstaeckeri* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Zoo Mex* 1997, 70: 55-63.

Groot AT. Sexual behaviour of the green capsid bug. PhD thesis. University of Wageningen. 2000.

Guerenstein PG, Guerin PM. A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Entomol Exp Appl* 2004; 111:151-155.



Guerenstein PG, Guerin PM. Olfactory and behavioral responses of the blood-sucking *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. J Exp Biol 2001; 204: 585-597.

Gringorten JL, Friend WG. Wing-beat pattern in *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae) during exhaustive flight. Can J Zool 1979, 57:391-395.

Gurevitz JM, Ceballos LA, Kitron U, Gürtler RE. Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. J Med Entomol 2006; 43: 143-150.

Kälin M, Barrett FM. Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Ann Entomol Soc Am 1975; 68:126-134.

Kalrson P, Luscher M. " Pheromones" a new term for a class of biologically active substances. Nature 1959, 183: 155-156.

Lazzari CR. Temperature preference in *Triatoma infestans*. Bull Entomol Research 1991; 81:273-276.

Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 1992; 38: 895-903.

Lazzari CR, Minoli AS, Barrozo RB. Chemical ecology of insect vectors: the neglected temporal dimension. *Trop Parasitol* 2004; 20: 506-507.

Lehane MJ, Schofield CJ. Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Trans Roy Soc Trop Medic Hyg* 1976; 70:520-526.

Lehane MJ, Schofield CJ. Field experiments on dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Trans Roy Soc Trop Medic Hyg* 1981; 75: 399-404.

Lehane MJ, Schofield CJ. Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bull Entomol Res* 1982; 72:497-510.

Lehane MJ, Mcewen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop* 1992; 52: 27–38.

Lima MM, Juberg P, Almeida JR. Behavior of triatomines (Hemiptera:Reduviidae) vectors of Chagas` disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 8: 271-274.

Lorenzo Figueiras AN, Lazzari C. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiol Entomol* 1998; 23: 33-37.

Lorenzo Figueiras AN, Lazzari C. Aggregation behaviour and interspecific responses in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002a; 97: 569-571.

Lorenzo Figueiras AN, Lazzari C. Aggregation behaviour and interespecific responses in three species of Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002b; 93: 133-137.

Lorenzo MG, Lazzari CR. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. J. Insect Entomol 1996; 42: 903-907.

Lorenzo MG, Lazzari CR. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Acta Trop 1998; 70: 163-170.

Lorenzo MG, Lazzari CR. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. Acta Trop 1999; 72: 241-249.

Lorenzo Figueiras AN, Kenigsten A, Lazzari CR. Aggregation in haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. J Insect Physiol 1994; 40: 312-316.

Manrique G, Lazzari CR. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(4): 629-633.

Manrique G, Lazzari CR. Existence of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I-Behavioural Evidence. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90:645-648.

Mcewen PK, Lehane MJ. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Insect Sci Appl 1993; 14:461-464.

Mcewen PK, Lehane MJ. Relationships between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). J Appl Entomol 1994; 117:217-223.

Mcneil JN. Behavioral ecology of pheromone mediated communication in moths and its importance in the use of pheromone traps. Ann Rev Entomol 1991; 36, 407-430.

Minoli SA, Lazzari CR. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. Acta Trop 2006; 97:324-30.

Millar JG, Knudson AE, Mcelfresh JS, Gries R, Gries G, Davis JH. Sex attractant pheromone of the pecan nut casebearer (Lepidoptera: Pyralidae). Bioorg Medi Chem 1996; 4:331-339.

Miller JR, Roelofs WL. Individual variation in pheromone sexual component ratios in two populations of the redbanded leafroller moth, *Argyrotaenia velutinana*. Environ Entomol 1980; 9: 359-363.

Mota TRP. Sinais de agregação em *Panstrongylus megistus* e a interação desta espécie com *Triatoma infestans* no interior de abrigos. Orientação: Marcelo Gustavo Lorenzo. 2006. 104 p. il. Dissertação (mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>.

Nation JL. Insect Physiology and Biochemistry. University of Florida, CRC Press, 2002.

Noireau F, Dujardin JP. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96:385-389.

Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94:23-27.

Núñez JA. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). Bull Ent Res 1982; 72: 252–262.

Núñez JA. Behaviour of Triatominae bugs. In: Brenner RR, Stoka AM, editores. Chagas` disease Vectors, vol II Anatomic and Physiological aspects. CRC Press, 1987. p 1-30.

Ondarza RN, Martínez-Gutiérrez A, Malo EA. Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). J Econom Ent 1986; 79 (3):689-692.

Ondarza RN, Gutierrez-Martinez A, Malo EA. Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). J Econom Entomol 1987; 79:688-692.

Parker GA. Sperm Competition and its evolutionary consequences in the insects. Bio Rev 1970; 45: 525-567.

Parker GA. Courtship persistence and female-guarding as male time investment strategies. Behaviour 1974; 48: 157-184.

Pires HHR, Lorenzo MG, Diotaiuti L, Lazzari CR, Lorenzo Figueiras AN. Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. Acta Trop 2002; 81(1):47-52.

Pires HHR, Lorenzo MG, Lazzari CR, Diotaiuti L, Manrique G. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae): an experimental study. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(3): 295-300.

Pontes GB, Bohman B, Unelius CR, Lorenzo MG. Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. J Chem Ecol 2008; 34(4):450-7.

Raina AK, Kingan TG, Matto AK. Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. Science 1992; 244: 796-798.

Ríos Candelaria E. Análisis químico y conductual de los compuestos volátiles emitidos por *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), vectos de la enfermedad de Chagas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chiapas, México. 1999.

Reisenman CE, Lazzari CR, Giurfa M. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. J Comp Physiol 1998; 183: 533-541.

Rojas JC, Rios-Candelaria E, Cruz López L, Santiesteban A, Bondc Ompean JG, Brindis Y, Malo, EA. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compound of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 2002; 39:256-265.

Rojas JC, Cruz López L. Sexual behaviour in two species of *Tritoma ptylosoma* complex (Hemiptera; Reduviidae) under laboratory conditions. J Med Entomol 1992; 29: 13-18.

Rojas JC, Malo EA, Gutierrez-Martinez A, Ondarza RA. Mating behaviour of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. An Entomol Soc Am 1990; 83: 598–602.

Rossiter M, Staddon BW. 3-Methyl-2hexanone from the triatinae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera: Reduviidae). Experientia 1983; 39: 380-381.

Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Zootaxa 2007; 1443: 55–64.

Schofield CJ, Matthews JNS. Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by *Triatoma infestans*. J Trop Med Hyg 1985; 88: 211-222.

Schofield CJ, Patterson JW. Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 1977, 13: 727-734.



Schofield CJ, Upton CP. Brindley's scent-glands on the metasternal scent glands of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Brasil Biol* 1978; 38: 665-678.

Schofield CJ. Triatominae: Biología y control. Eurocommunica Publications, West Sussex, 1994.

Schweigmann N, Vallve S, Muscio O, Ghillini M, Alberti A, Wisnivesky Colli C. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Med Vet Entomol* 1988; 2(4):401-404

Settembrini BP. Circadian rhythms of locomotor activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 1984; (21)2:204-212.

Shorey HH. Manipulation of insect pests of agricultural crops. In: Shorey HH, McKelvey JJ, eds. Chemical control of insects behaviour. Theory and application. Jhon Wiley & Sons, New York. 1973. p 353-367.

Simmons LW. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, 2001.

Sjogren RD, Ryckman RE. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by

collections at black light traps (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol 1966; 3(1):81-92.

Staddon BW. The scent glands of Heteroptera. Adv Insect Physiol, 1979; 14: 131-157.

Schofield CJ. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. Bull Entomol Res 1979, 69:363-379.

Taneja J, Guerin PM. Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. J Comp Physiol A 1995; 176: 455-464.

Taneja J, Guerin PM. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. J Comp Physiol A 1997, 181: 21-34.

Thornhill R, Alcock J. The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge, USA, 1983.

Tonn RJ, Espínola H, Mora E, Jiménez JE. Trampa de luz negra como método de captura nocturna de Triatomíneos en Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb 1978; 18:25–30.

Van Der Pers JNC. Comparison of electroantennogram response spectra to plant volatiles in seven species of Yponomeuta and in the tortricid adoxophyes orana. Ent Exp Appl 1980; 30: 181-192.

Van Der Pers JNC, Minks AK. Measuring pheromone dispersion in the field with the single sensillum recording technique, In: Chapman & Hall, eds. Insect Pheromone Research: New directions. New York, 1997. p 359-371.

Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Kitron U, Gurtler RE. Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. J Med Entomol 2004; 41(4):614–621.

Velasquez A A. Introducción al estudio de la atracción por el olor en reduvidos hematofagos transmisores de la enfermedad de Chagas Investigaciones de laboratorio con el *Triatoma phyllosoma pallidipennis* (Stal). Arch Ven Med Trop Parasitol Méd 1965; 5: 329-344.

Velasquez AA. Atracción por olor en ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus* (Stal). Rev Inst Med Trop São Paulo 1968; 10(4): 242-246. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener -<http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Vilela EF, Della Lucia TMC. Feromonios de Insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2ª edição. Universidade de Viçosa, MG. 2001.

Vinhaes MC, Dias JCP. Chagas disease in Brazil. *Cad Saúde Pública* 2000; 16: 7-12.

Vitta ACR, Figueiras NA, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG. Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 865-867.