

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

**Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis*  
(Reduviidae: Triatominae)**

por

Ana Cristina Renna de Vitta



**Belo Horizonte**

**Abril 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

**Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis***  
**(Reduviidae: Triatominae)**

por

Ana Cristina Renna de Vitta

Tese apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Doutora em  
Ciências na área de concentração  
em Doenças Infecciosas e  
Parasitárias.

Orientador: Dr. Marcelo G. Lorenzo

**Belo Horizonte**

**Abril 2009**

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

V851c  
2009

Vitta, Ana Cristina Renna de.

Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae: Triatominae) / Ana Cristina Renna de Vitta. – Belo Horizonte, 2009.

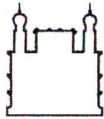
xxii, 144 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 143 - 166

Tese – Tese para obtenção do título de Doutora 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/prevenção & controle 2. Triatominae/crescimento & desenvolvimento 3. Eletrofisiologia/métodos 4. Atrativos sexuais/análise I. Título II. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Orientação).

CDD – 22. ed. - 616.936 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

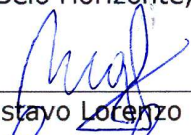
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

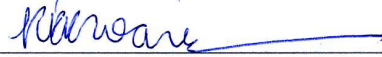
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Ata da vigésima quinta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Ana Cristina Renna de Vitta, sob a orientação da Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo.**

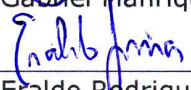
Aos vinte e quatro dias do mês de abril do ano de dois mil e nove, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, a defesa da vigésima quinta tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese da aluna Ana Cristina Renna de Vitta intitula-se "Comportamento sexual de *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae: Triatominae)". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo - CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Gabriel Manrique - UBA/Argentina (membro titular), Dr. Eraldo Rodrigues de Lima - UFV (membro titular) e Dr. Ricardo Andrade Barata - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após argüir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Marcelo Gustavo Lorenzo, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e quatro de abril de dois mil e nove.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gabriel Manrique

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Eraldo Rodrigues de Lima

Naturalmente, avançar é uma infidelidade – para com os outros, o passado, as antigas idéias que cada um faz de si. Quem sabe cada dia não devesse conter pelo menos uma infidelidade essencial ou uma traição necessária.

**Hanif Kureishi, *Intimidade***

Ao meu Pai, Carlos de Vitta, historiador, professor, sociólogo, teólogo,  
humanitário e, sem dúvida, o homem mais surpreendente que conheci.

Ao Leonardo Sydney, um presente da vida, por seu apoio que nunca faltou,  
por sua paciência e carinho.

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Marcelo G. Lorenzo, meu orientador e também mentor, que soube estimular, aconselhar, criticar e nortear de forma plena o desenvolvimento deste trabalho. Quero expressar meu carinho e especial agradecimento por todos esses longos anos de agradável convivência e registrar a grande importância que você desempenhou em minha formação acadêmica e pessoal. Com você aprendi que tudo que se faz com entusiasmo, integridade e dedicação, sempre atingirá a meta desejada. Aqui deixo meu profundo agradecimento!

À Dra. Liléia Diotaiuti, pela primeira oportunidade de estágio no LATEC, pela orientação em minha iniciação científica e pelo exemplo de coragem.

Ao Dr. João Carlos Pinto Dias, pela presença sempre humilde e sábia.

Ao Dr. Carlos Zani, por sua imensa colaboração na realização dos trabalhos de cromatografia gasosa. Obrigada pelo carinho e amizade com que me recebeu e pela paciência ao me introduzir nos conhecimentos desta metodologia.

Ao Dr. Claudio Lazzari, pela valiosa contribuição e leitura minuciosa do primeiro artigo gerado por esta tese.

Ao Prof. Rikard C. Unelius e o estudante de doutorado Björn Bohman, ambos da Universidade de Kalmar, na Suécia, pelo auxílio no trabalho de identificação dos componentes químicos.

Ao Dr. Peter Ockenfels (Syntech), pela acoplagem do CG/EAD e pelo treinamento oferecido, sem os quais não seria possível o trabalho de eletrofisiologia.

À direção do Centro de Pesquisas René Rachou, nas pessoas dos Drs. Alvaro José Romanha e Rodrigo Corrêa Oliveira.

À Cris e Andréia, secretárias da Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo carinho com que sempre me trataram, por todo apoio e auxílio prestados durante minha estada nesta instituição.



Aos amigos de longa caminhada do Laboratório de Triatomíneos: Inês, Ale,

Angélica, Silvinha, Rita, Raquel, D. Maria e João Paulo, pela cumplicidade e afeto.

Aos novos e queridos colegas do LATEC: Fernando, Carlota, Grasi, Gina, Tessa, Gabriel, Elisa, Letícia, Luciana, Juliana, Ademilson, Bruna e Zé, pelo convívio que tornou minha passagem ainda mais agradável e divertida.

À Ana Carolina Lustosa Lima, bacharel em estatística e à Dra. Alessandra Guarneri pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao João de Deus, pelo apoio inabalável e pela prontidão com que trabalhou para deixar funcionando os aparelhos de olfatometria e voo, sem os quais não seria possível alcançar grande parte dos nossos objetivos.

Aos meus grandes amigos, Silvana, Dani e Alexandre, Theo, Claudinha, Betinho, Kelly, Iracenir e Tê, pelas palavras de força e encorajamento, pelo companheirismo e alegria.

À Adriana Renna de Vitta, pelas correções e sugestões dadas para a elaboração deste texto.

À minha amiga e companheira Raquel Aparecida Ferreira, pelo exemplo de luta e candura, pelas inúmeras provas de amizade e carinho. É muito bom ter você por perto!

À minha admirável colega de trabalho e grande amiga Alessandra Guarneri, pelas valiosas sugestões na finalização desta tese, pelo exemplo de dedicação e força, pela ternura e cumplicidade. Obrigada por estar aqui!

À minha querida amiga Maria Angélica de Oliveira pelo enriquecedor convívio, pelas eufóricas e instigantes conversas e pelo imenso carinho a mim presenteado ao longo destes anos.

À Inês, pela ajuda indispensável, pelo cuidado e pelos atrasos suportados.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais do CpqRR:

Ezequias, Camila, Dra. Tânia Alves, Antônia, Elaine, Luís, Márcia e Carolina por tornar meus trabalhos de cromatografia tão agradáveis.

Ao Dr. Nelder Figueiredo Gontijo e ao Dr. Luciano Andrade Moreira por dedicarem seu tempo à leitura de parte desta tese e pelas importantes contribuições no período de minha qualificação.

À minha irmã de coração Luciana Renna Alves.

Aos meus irmãos e inseparáveis companheiros, Adriana, Carlos Henrique, Luis Carlos e Marisa, por me apoiarem, por compreender minhas escolhas e as consequentes ausências delas advindas. Amo muito vocês!

À minha mãe Terezinha Renna de Vitta (in memoriam), pela intensidade com que viveu e por ter nos ensinado que a felicidade está na realização dos nossos desejos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização e conclusão do Curso de Pós-Graduação.

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

A todos os animais de experimentação, sem os quais este trabalho não teria existido.

A todos, enfim, que auxiliaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

# Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 TRIATOMÍNEOS.....	24
1.2 O <i>Triatoma brasiliensis</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	25
1.3 COMPORTAMENTO SEXUAL E REPRODUÇÃO.....	27
1.4 APROXIMAÇÃO DOS SEXOS.....	29
1.5 MECANISMOS DE QUIMIORECEPÇÃO OLFATIVA.....	30
1.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A UM DETECTOR ELETROANTENÓGRAFICO (CG-EAD).....	32
1.7 OLFATOMETRIA.....	34
1.8 COMUNICAÇÃO QUÍMICA EM TRIATOMÍNEOS.....	35
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	41
3.1 USO DE ABRIGOS POR ADULTOS DE <i>Triatoma brasiliensi</i> .....	42
3.2 INÍCIO DA ATIVIDADE DE VOO EM MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> MEDIADO POR ODOR DE FÊMEA.....	44
3.3 COMUNICAÇÃO QUÍMICA ENTRE SEXOS EM <i>Triatoma brasiliensis</i> - O PAPEL DAS GLÂNDULAS EXÓCRINAS.....	47
3.4 RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DA ANTENA DE MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> AOS ODORES DA GLÂNDULA METASTERNAL DE FÊMEAS.....	50
3.5 COMPORTAMENTO DE CÓPULA E ASSOCIAÇÃO PÓS- ACASALAMENTO EM <i>Triatoma brasiliensis</i> .....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 USO DE ABRIGOS POR ADULTOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> .....	56

4.1.1 INSETOS.....	56
4.1.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	56
4.1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4.2 INÍCIO DA ATIVIDADE DE VOO EM MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> MEDIADO POR ODOR DE FÊMEA.....	60
4.2.1 INSETOS.....	60
4.2.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	60
4.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
4.3 COMUNICAÇÃO QUÍMICA ENTRE SEXOS EM <i>Triatoma brasiliensis</i> – O PAPEL DAS GLÂNDULAS EXÓCRINAS.....	67
4.3.1 INSETOS.....	67
4.3.2 OLFATOMETRIA.....	67
4.3.3 ENSAIOS DE ESCOLHA SIMULTÂNEA.....	71
4.3.4 INFLUÊNCIA DOS ODORES DAS GLÂNDULAS METASTERNAIS E DE BRINDLEY NA FREQUÊNCIA DE CÓPULA.....	72
4.4 RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DA ANTENA DE MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> AOS ODORES DA GLÂNDULA METASTERNAL DE FÊMEAS.....	74
4.4.1 INSETOS.....	74
4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS SECREÇÕES DAS GLÂNDULAS METASTERNAIS.....	74
4.4.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	76
4.4.4 COMPOSTOS QUÍMICOS.....	77
4.4.5 ELETROANTENODETECÇÃO ACOPLADA A CROMATOGRAFIA GASOSA (CG-EAD).....	77
4.5 COMPORTAMENTO DE CÓPULA E ASSOCIAÇÃO PÓS-ACASALAMENTO EM <i>Triatoma brasiliensis</i> .....	81
4.5.1 INSETOS.....	81
4.5.2 COMPORTAMENTO SEXUAL.....	81
4.5.3 MATURAÇÃO SEXUAL.....	82
4.5.4 POLIANDRIA E ASSOCIAÇÃO PÓS-ACASALAMENTO (APA).....	83
4.5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
5 RESULTADOS.....	85

<b>5.1 USO DE ABRIGOS POR ADULTOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i>.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1.1 A ATIVIDADE BASAL EM ABRIGOS.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1.2 EFEITO DA PRESENÇA DE ODOR DE INSETOS DO SEXO OPOSTO.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1.3 PADRÃO TEMPORAL DE SAÍDAS, DE ATIVIDADE LOCOMOTORA E DE TENTATIVAS DE CÓPULA ENTRE MACHOS.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2 INÍCIO DA ATIVIDADE DE VOO EM MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> MEDIADO POR ODOR DE FÊMEA.....</b>	<b>91</b>
<b>5.3 COMUNICAÇÃO QUÍMICA ENTRE SEXOS EM <i>Triatoma brasiliensis</i> – O PAPEL DAS GLÂNDULAS EXÓCRINAS.....</b>	<b>96</b>
<b>5.4 RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DA ANTENA DE MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> AOS ODORES DA GLÂNDULA METASTERNAL DE FÊMEAS.....</b>	<b>101</b>
<b>5.5 COMPORTAMENTO DE CÓPULA E ASSOCIAÇÃO PÓS-ACASALAMENTO EM <i>Triatoma brasiliensis</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>5.5.1 COMPORTAMENTO SEXUAL.....</b>	<b>105</b>
<b>5.5.2 MATURAÇÃO SEXUAL E FREQUÊNCIA DE ACASALAMENTO.....</b>	<b>107</b>
<b>5.5.3 POLIANDRIA E ASSOCIAÇÃO PÓS-ACASALAMENTO (APA).....</b>	<b>114</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>121</b>
<b>6.1 USO DE ABRIGOS POR ADULTOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>6.2 INÍCIO DA ATIVIDADE DE VOO EM MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> MEDIADO POR ODOR DE FÊMEA.....</b>	<b>125</b>
<b>6.3 COMUNICAÇÃO QUÍMICA ENTRE SEXOS EM <i>Triatoma brasiliensis</i> – O PAPEL DAS GLÂNDULAS EXÓCRINAS.....</b>	<b>127</b>
<b>6.4 RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS DA ANTENA DE MACHOS DE <i>Triatoma brasiliensis</i> AOS ODORES DA GLÂNDULA METASTERNAL DE FÊMEAS.....</b>	<b>130</b>
<b>6.5 COMPORTAMENTO DE CÓPULA E ASSOCIAÇÃO PÓS-ACASALAMENTO EM <i>Triatoma brasiliensis</i>.....</b>	<b>132</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>142</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura da capa</b>	<i>Triatoma brasiliensis</i> .	I
<b>Figura 1.</b>	Distribuição geográfica (a) de <i>Triatoma brasiliensis</i> (b) Neiva, 1911 (AL: Alagoas; BA: Bahia; CE: Ceará; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; RN: Rio Grande do Norte; SE: Sergipe; TO: Tocantins). Fonte: Carcavallo 1999.	25
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto (Chapman, 1998).	31
<b>Figura 3.</b>	Desenho experimental para o estudo da atividade de triatomíneos associados a um abrigo artificial. À direita um detalhe do abrigo artificial de papelão corrugado.	58
<b>Figura 4.</b>	A) Desenho esquemático da gaiola de voo. B) Arena experimental utilizada no interior da gaiola.	63
<b>Figura 5-6.</b>	Gaiola de voo utilizada para analisar o início da atividade de voo em adultos de <i>Triatoma brasiliensis</i> .	65
<b>Figura 7.</b>	Desenho esquemático do olfatômetro em "T" mostrando as escalas em cm (por Arnaldo Aroeira).	70
<b>Figura 8.</b>	Desenho esquemático do sistema de aquecimento das amostras de glândulas de adultos de <i>T. brasiliensis</i> .	75
<b>Figura 9.</b>	Desenho esquemático do sistema de extração por SPME, desorção térmica e identificação das substâncias em CG-EM das GMs de <i>T. brasiliensis</i> .	76
<b>Figura 10.</b>	Desenho esquemático de um sistema de CG-EAD (Syntech, 2001).	79
<b>Figura 11.</b>	Detalhe ampliado da interface do sistema CG-EAD (Syntech, 2001).	80
<b>Figura 12.</b>	Padrão temporal de saídas do abrigo em adultos de <i>T. brasiliensis</i> . Número médio de fêmeas (A) e machos (B) que saíram do abrigo por hora na ausência e na presença de odores do sexo oposto. A barra acima do gráfico representa o ciclo de iluminação artificial, branco: fase de luz; preto: fase escura. Teste ANOVA de medidas repetidas ( $p < 0,001$ ) e análise post hoc mediante o teste de Tukey ( $*p < 0,001$ , $**p < 0,001$ ).	88
<b>Figura 13.</b>	Padrão temporal de atividade locomotora em torno do abrigo em adultos de <i>T. brasiliensis</i> . Número médio de passagens em fêmeas (A) e machos (B) na ausência e presença de odores do sexo oposto. A barra acima do gráfico representa o ciclo de iluminação artificial: branco: fase de luz; preto: fase escura. Diferenças significativas na atividade locomotora ao longo do tempo foram definidas por meio da ANOVA de medidas repetidas de dois fatores (limite discriminante, $P < 0,05$ ) e	89

análise pos hoc mediante o teste de Tukey (\* $p < 0,001$ ).

- Figura 14.** Padrão temporal de tentativas de cópulas realizadas pelos machos. Os dados graficados representam o número médio de tentativas de cópula por hora realizada por machos na ausência e na presença de odores de fêmea. Diferenças significativas no número médio de tentativas de cópula ao longo do tempo foram definidas por meio da ANOVA de medidas repetidas de um fator (limite discriminante,  $P < 0,05$ ) e análise pos hoc mediante o teste de Tukey (\* $p < 0,0001$ ). 90
- Figura 15.** Frequência média de início da atividade de voo em machos e fêmeas de *T. brasiliensis*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos. 93
- Figura 16.** Orientação de machos e fêmeas de *T. brasiliensis* durante o início da atividade de voo. Os diagramas em roseta representam a frequência de escolha dos ângulos correspondentes a cada intervalo de  $20^\circ$  dentro do círculo. As linhas no diagrama caracterizam o ângulo médio ( $\mu$ ) com intervalo de confiança de 95%. A direção da corrente de ar foi convencionalmente associada com o ângulo  $0^\circ$ . Resultados não significativos representam distribuição uniforme (teste de Rayleigh com  $P \geq 0,05$ ) e ausência de direcionamento (teste-V com  $P \geq 0,05$ ). \*\*Na série experimental onde os machos foram estimulados com odor de fêmeas (E), os dados não apresentaram uma distribuição uniforme (teste Rayleigh,  $P \leq 0,05$ ) e neste caso, a orientação ocorreu no sentido da fonte de estímulo ( $0^\circ$ ) (teste-V,  $P \leq 0,05$ ). \*Quando as fêmeas foram confrontadas com corrente de ar transportando odor de machos (D), os dados também não apresentaram uma distribuição uniforme (teste Rayleigh,  $P \leq 0,05$ ), no entanto, o comportamento de orientação não foi direcionado à fonte de estímulo ( $0^\circ$ ) (teste-V,  $P \geq 0,05$ ). 94
- Figura 17.** Frequência de início de voo em função do tempo em, A) machos e B) fêmeas de *T. brasiliensis* confrontados com diferentes estímulos. 95
- Figura 18.** Respostas de fêmeas de *T. brasiliensis* no olfatômetro em "T". 97
- Figura 19.** Respostas de machos de *T. brasiliensis* no olfatômetro em "T". GMFO= fêmeas com o orifício das glândulas metasternais ocluído, CF= fêmeas tratadas com parafina em outra região da superfície do corpo (controle), GMMO= machos com o orifício das glândulas metasternais ocluído e CM= machos tratados com parafina em outra região da superfície do corpo (controle). 98
- Figura 20.** Frequência de cópula em casais de *T. brasiliensis*: o papel das secreções exócrinas. Controle= casais intactos, CM= machos com parafina aplicada no metatórax dorsal, sem ocluir as glândulas, CF= fêmeas com parafina aplicada no metatórax dorsal, sem ocluir as glândulas, GMB/MFO= machos e fêmeas com os orifícios das glândulas metasternais e de Brindley ocluídos, GMFO= fêmeas com os orifícios das glândulas metasternais ocluídos, GMMO= machos com os orifícios das glândulas metasternais ocluídos, GBFO= fêmeas com os orifícios das glândulas de Brindley ocluídos e GBMO= machos com os orifícios das glândulas de Brindley ocluídos. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas (teste  $X^2$  seguido de comparações múltiplas de Bonferroni,  $P < 0,003$ ). 100
- Figura 21.** Perfil cromatográfico das substâncias produzidas pelas glândulas metasternais de 102

fêmeas de *T. brasiliensis* (amostra com 08 GMs) identificados por meio da CG/EM (Shimadzu 17A, Shimadzu 5050A). Foram representados apenas os compostos mais abundantes. Os picos correspondentes são 1: 2-butanona, 2: 3-pentanona, 9: 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano 11: (2S)-metil-1-butanol, 16: (4R)-metil-1-heptanol, 17: desconhecido e 18) (1R)-feniletanol. A lista completa pode ser vista na tabela 1.

- Figura 22.** Respostas simultâneas do CG (FID) e do EAD utilizando uma antena de macho de *T. brasiliensis* estimulada pelos componentes da secreção das glândulas metasternais (10) de fêmea. Os diferentes compostos são: 1) 3-pentanona, 2) 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano 3) 2-metil-1-butanol, 4) 4-metil-1-heptanol e 5) 1-feniletanol. 104
- Figura 23.** Frequência relativa dos diferentes tipos de comportamento de rejeição apresentados por fêmeas (MA: movimentos abdominais, AC: achatamento corporal). 107
- Figura 24.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópula no tratamento com machos e fêmeas em jejum (**T1**). O gráfico inserto: representa a frequência diária de cópulas em função da idade. 108
- Figura 25.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos e fêmeas alimentados (**T2**). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópulas em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo. 109
- Figura 26.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos em jejum e fêmeas alimentadas (**T3**). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópula em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo. 111
- Figura 27.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos alimentados e fêmeas em jejum (**T4**). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópulas em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo. 112
- Figura 28.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos jovens em jejum e fêmeas alimentadas (**T5**). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópulas em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo. 113
- Figura 29.** Duração da primeira cópula nos tratamentos 1M:1F e 3M:1F. 116
- Figura 30.** Duração da cópula no primeiro, segundo e terceiro acasalamento da série 3M:1F-. 117
- Figura 31.** Duração da primeira associação pós-acasalamento (APA) nas diferentes séries experimentais. A linha pontilhada indica a duração máxima da APA na série 1M:1F. 118
- Figura 32.** Duração da segunda associação pós-acasalamento (APA) nas diferentes séries experimentais. A linha pontilhada indica a duração máxima da APA na série 1M:1F. 119
- Figura 33.** Duração da terceira associação pós-acasalamento (APA) nas diferentes séries experimentais. A linha pontilhada indica a duração máxima da APA na série 1M:1F. 120



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Escolha dos adultos de <i>T. brasiliensis</i> nas séries de calibragem do olfatômetro (SA=sem corrente de ar, AL=corrente de ar limpo). Diferenças significativas entre o estímulo teste e o controle foram avaliadas utilizando o teste Binomial. * $P \leq 0,05$ e n.s $P \geq 0,05$ .	69
<b>Tabela 2.</b>	Compostos identificados nas glândulas metasternais (GMs) de fêmeas de <i>T. brasiliensis</i> através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.	103

## **Lista de Abreviaturas**

- CG-EAD.** Cromatografia Gasosa acoplada ao Eletroantodetector.
- APA.** Associação Pós-acasalamento.
- CG-EM.** Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectômetro de massa.
- EAG.** Eletroantografia.
- CG.** Cromatografia Gasosa.
- FID.** Detector de Ionização em Chama.
- UR.** Umidade Relativa.
- SPME.** Microextração em fase Sólida.
- ANOVA.** Análise de Variância.
- KCL.** Solução de Cloreto de Potássio.
- GMs.** Glândulas metasternais

## RESUMO

---

O presente estudo privilegia os aspectos comportamentais relacionados com a atração sexual em *Triatoma brasiliensis*. Considerando o fato de que o abrigo é um recurso fundamental para a sobrevivência na maioria das espécies de triatomíneos e que o sucesso reprodutivo se dá por meio de um eficaz encontro com o parceiro sexual, optamos por analisar o padrão de atividade locomotora em relação ao abrigo por adultos desta espécie durante a fase escura do ciclo diário e verificar o efeito da presença de coespecíficos nesta atividade. Uma vez fora do abrigo e motivados a procurar alimento e/ou parceiro para o acasalamento, estes insetos podem caminhar ou voar em direção à fonte de estímulo. Neste sentido, avaliamos se existem sinais químicos emitidos por indivíduos do sexo oposto que sejam capazes de disparar o voo de machos ou fêmeas. Sabendo que estes insetos deslocam-se fundamentalmente caminhando, testamos se há comunicação mediada por odor entre os sexos através da técnica de olfatometria. O próximo passo foi determinar a origem do sinal químico que promovia as respostas dos machos no olfatômetro. Foi realizada a identificação química da secreção das glândulas metasternais através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) e os diferentes componentes da secreção destas glândulas foram testados na antena de machos de *T. brasiliensis* por meio de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAD). Adicionalmente, foram descritos detalhadamente os aspectos gerais do comportamento durante a cópula e caracterizados fatores fisiológicos, tais como idade e estado nutricional, que afetam a receptividade da fêmea. Finalmente, o efeito da presença de grupos de machos sobre a duração da cópula e a existência de comportamentos relacionados com competição sexual entre indivíduos foi analisada. Os resultados encontrados mostram que a atividade locomotora nas proximidades do abrigo (saídas do abrigo e atividade locomotora) é maior na primeira hora da fase escura, tanto em fêmeas quanto em machos de *T. brasiliensis*. Além disso, odor de fêmea foi capaz de provocar um aumento significativo no número de machos que saíram do abrigo. Uma vez fora do abrigo, os machos aumentaram sua atividade quando odor de fêmea foi apresentado. Verificamos que uma proporção importante dos machos e fêmeas inicia o voo quando confrontados com correntes de ar limpo, porém de maneira não orientada. A atividade de início de voo parece ser maior durante as primeiras horas da fase escura

tanto em fêmeas quanto em machos. Foi observado que a presença de odor de fêmea provoca um aumento da atividade de início de voo nos machos. Além disso, foi possível comprovar que as respostas dos machos foram orientadas contra a corrente de ar quando na presença de odor de fêmea. Nossos resultados mostram que as secreções das glândulas metasternais de fêmeas são relevantes para o sucesso da cópula nesta espécie. Surpreendentemente, os dados mostraram que as secreções das glândulas de Brindley de fêmea também parecem relevantes para o sucesso da cópula em *T. brasiliensis*. Nos testes de olfatômetro verificamos que machos são significativamente atraídos por odor de fêmea e de macho. Adicionalmente, foi possível demonstrar que os odores emitidos pelas glândulas metasternais de fêmea são responsáveis pela resposta de orientação dos machos no olfatômetro. Os dados mostram que as glândulas metasternais não são a fonte dos sinais químicos que provocaram a atração de machos por machos. As glândulas metasternais de *T. brasiliensis* também estão envolvidas na síntese de substâncias voláteis, basicamente cetonas, dioxolanos e álcoois, sendo a 3-pentanona o principal componente em ambos os sexos. No estudo de eletrofisiologia, 100% das antenas responderam à 3-pentanona, 71% ao (4*R*)-metil-1-heptanol, 28% ao (2*S*)-metil-1-butanol e (1*R*)-feniletanol e 14% ao 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano. Fêmeas de *T. brasiliensis* exibem três tipos de comportamento de rejeição em resposta as tentativas de cópulas realizadas pelos machos: movimentos abdominais, achatamento corporal e evasão. A idade afeta a motivação dos machos para realizar tentativas de cópula e o estado nutricional afeta a receptividade da fêmea. Machos de *T. brasiliensis* reagem à presença de machos competidores guardando a fêmea por um longo intervalo de tempo. A análise do comportamento de fêmeas sugere que elas são capazes de reconhecer o estado nutricional dos machos e aceitar com maior frequência as tentativas de cópula dos machos alimentados.

## ABSTRACT

---

The present study privileges behavioral aspects related with the sexual communication of *Triatoma brasiliensis*. The long range communication between sexes mediated by odors was evaluated using an olfactometer. Males were significantly attracted by odors of females or from other males. We tested whether males or females are activated to leave their refuges in the presence of odors from individuals of the opposite sex. The results show that male *T. brasiliensis* respond to the presence of female odor leaving their refuges and showing a significantly higher locomotor activity. Moreover, flight initiation experiments demonstrated that male insects take off more frequently and in an oriented manner in the presence of air currents associated to female odor. The metasternal glands of females showed to be the source of the signals mediating male orientation. Nevertheless, the products of male MGs were not relevant to mediate the observed male orientation to air currents associated to the odor of males. Our results demonstrated that the metasternal glands of *T. brasiliensis* are involved in the synthesis of volatile substances. These glands produce basically ketones, dioxolanes and alcohols; 3-pentanone was the major constituent of the mixture for both sexes. The use of GC-EAD allowed showing that male antennae respond to at least five of the main compounds produced by female MGs. The relevance of these results for understanding the behavioral repertoire of this species, particularly in the sexual context, is discussed. The frequency of male copulatory attempts varied according to insect age. Females of this species showed three types of rejection behaviour in response to male copulatory attempts: flattening, abdominal movements and evasion. The analysis of female behavior revealed that this rejection frequency was kept unchanged during the pre-feeding period. After feeding, a gradual decrease in the number of rejections was observed, showing no rejections after approximately 8 days post-feeding. We suggest that feeding triggers the acceptance of the male copulatory attempts in *T. brasiliensis* females. Data showed that 70% of the females accepted to copulate with 3 different males in a one hour interval and the remaining 30% did so with two different males. Pos-mating association behaviour is described here for males of this species.

## INTRODUÇÃO

---



## **1 Introdução**

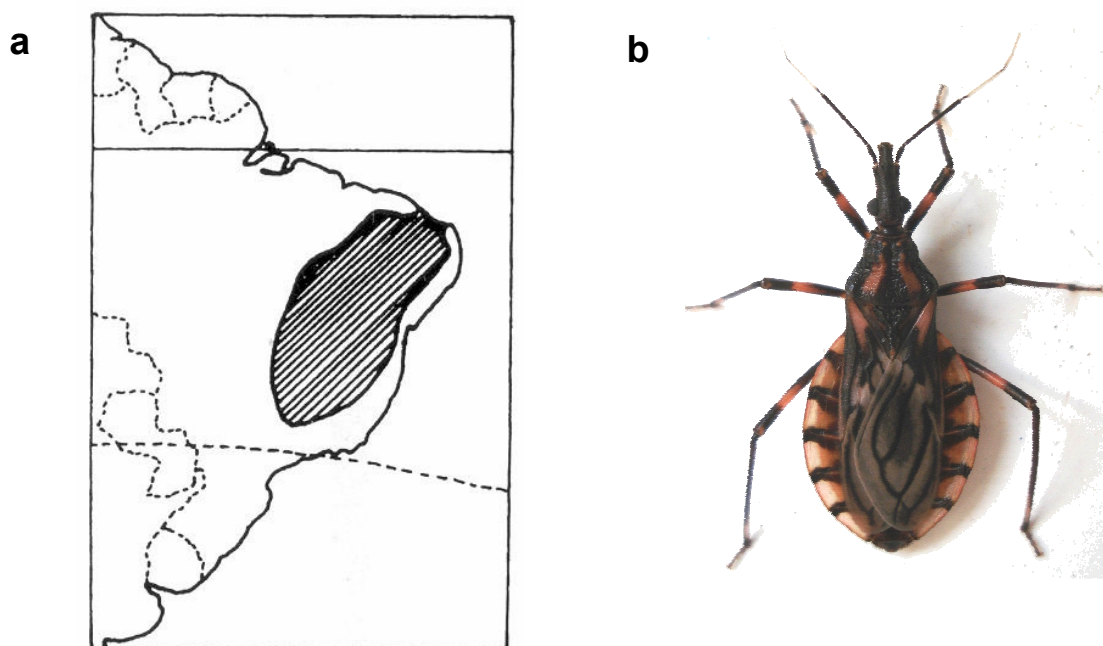
### **1.1 Triatomíneos**

Os triatomíneos são insetos da ordem Hemiptera, pertencentes à família Reduviidae e à subfamília Triatominae. Com base em características morfológicas, este grupo está dividido em 136 espécies, distribuídas em 18 gêneros e estes últimos estão contidos em 6 tribos. Vale ressaltar que 125 espécies de 17 dos gêneros e 4 tribos ocorrem exclusivamente no continente americano (Schofield 1994, Galvão et al. 2003, Poinar 2005, Galvão & Ângulo 2006). São insetos hemimetábolos que apresentam cinco estádios ninfais seguidos por uma fase adulta, a partir da qual adquirem asas e aparelho reprodutor. Os triatomíneos são exclusivamente hematófagos em todas as fases da vida, tendo como principais hospedeiros vertebrados endotérmicos. A ingestão de sangue de hospedeiros móveis e que podem se proteger está associada com a evolução de adaptações morfológicas e fisiológicas convergentes que facilitam o encontro preciso do hospedeiro, a rápida alimentação noturna e uma ingestão de sangue farta e ocasional (Friend & Smith 1985). Os triatomíneos evoluíram desenvolvendo eficientes receptores de calor e CO<sub>2</sub> que lhes permitem localizar as suas presas na escuridão (Friend & Smith 1985, Barrozo et al. 2003, Diehl et al. 2003, Barrozo & Lazzari, 2004). Seu aparelho bucal está adaptado para a penetração na pele do hospedeiro, para o encontro de vasos sanguíneos apropriados e para a alimentação rápida (Friend & Smith 1985)

A maioria das espécies de triatomíneos ocupa ecótopos silvestres, onde vivem em estreita associação com seus hospedeiros vertebrados. Entretanto, várias espécies também invadem e colonizam o peridomicílio e o domicílio humano, principalmente em áreas onde o habitat natural foi degradado. Diante dessas condições, algumas espécies de triatomíneos tornam-se extremamente sinantrópicas (Zeledón & Rabinovich 1981).

## 1.2 O *Triatoma brasiliensis* e a doença de Chagas

O *Triatoma brasiliensis* (Figura 1) é atualmente o principal inseto vetor da doença de Chagas na região Nordeste do Brasil e encontra-se amplamente distribuído pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe, e Rio Grande do Norte, além de Tocantins e Minas Gerais (Silveira et al. 1984, Carcavallo 1999) (Figura 1). No ambiente silvestre, esta espécie encontra-se associada aos abrigos de mamíferos tais como roedores, morcegos, marsupiais e vive dentro de rachaduras em formações rochosas típicas da região Nordeste (Alencar 1987). Os insetos desta espécie são capazes de invadir freqüentemente o ambiente domiciliar, formando colônias intradomiciliares e transmitindo o *Trypanosoma cruzi* ao homem e a outros hospedeiros domésticos (Dias & Vinhaes 2000). Além disso, em alguns estados brasileiros (Ceará, Bahia, Alagoas, Minas Gerais e Rio Grande do Norte) apresenta alta prevalência e variável porcentagem de infecção natural pelo *T. cruzi* (Costa et al. 2003). Estes dados indicam a necessidade de uma vigilância epidemiológica permanente e medidas contínuas de controle contra este inseto vetor.



**Figura 1.** Distribuição geográfica (a) de *Triatoma brasiliensis* (b) Neiva, 1911.  
Fonte: Carcavallo 1999.

A doença de Chagas é um dos principais problemas de saúde pública no continente americano. Esta zoonose acomete 8 milhões de pessoas em todo o mundo, enquanto outras 28 milhões vivem em áreas da América Latina sob risco de contrair a doença (TDR, 2005).

O agente etiológico da doença, o protozoário *T. cruzi* Chagas (1909) é transmitido aos humanos, principalmente através das fezes de triatomíneos infectados, depositadas na pele do hospedeiro no momento da picada (WHO 2005).

A infecção pode também acontecer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou por via transplacentária da mãe para o feto. O *T. cruzi* pode ainda ser transmitido por via oral, como por exemplo, através da ingestão de alimento contaminado com fezes de triatomíneos. Entretanto, a transmissão vetorial é a mais importante, sendo responsável por cerca de 80% de todos os casos da doença (Schofield 1994, Schofield & Dias 1999).

Uma vez que um tratamento específico para intervenções em larga escala na saúde pública ainda não está disponível, a principal estratégia dos serviços de saúde é a prevenção da transmissão através da eliminação de triatomíneos vetores domiciliados. Nesse contexto, onde o controle da doença se faz principalmente através do combate ao vetor, um maior conhecimento da fisiologia sensorial e do comportamento das espécies vetores torna-se essencial.

Neste sentido, o comportamento representa uma importante interface na interação dos organismos com o seu ambiente e, portanto deveria afetar de modo central a maneira como o planejamento das atividades de controle destes insetos deve ser desenvolvida. Compreender aspectos tais como os fatores que desencadeiam o voo, questão provavelmente crítica para facilitar a invasão de novas moradias, poderá levar à concepção de novas estratégias de combate ao vetor. Conhecer quais os sinais envolvidos nas diversas modalidades sensoriais que participam na orientação ao hospedeiro, ao parceiro sexual e ao abrigo, poderá adicionar informações sobre a comunicação química destes insetos. Além disso, descrever os tipos de respostas de orientação, para

melhor entender a maneira com que estes insetos procuram e encontram os recursos importantes para sua sobrevivência irá contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle baseados na manipulação de seu comportamento.

### **1.3 Comportamento Sexual e Reprodução**

Grande parte do sucesso adaptativo dos insetos deve-se a características de sua reprodução e desenvolvimento. Os insetos possuem vários tipos de reprodução, a saber, viviparidade, partenogênese, pedogênese, poliembrionia e hermafroditismo, no entanto, a maioria das espécies reproduz-se de maneira sexuada (Nation 2002). Isso significa que fêmeas e machos sexualmente maduros devem estar presentes no mesmo local ao mesmo tempo, para que, através do acasalamento, ocorra uma transferência de espermatozoides. Uma vez que a maioria dos insetos se reproduz de maneira sexuada, muitas espécies desenvolveram mecanismos de aproximação entre os sexos. Estes mecanismos podem incluir sinais visuais, sonoros, vibracionais, táteis e/ou sinais 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 envolve mecanismos de seleção espermática e 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 esperma vai fertilizar seus ovos. Parker (1970) define competição espermática como a competição do esperma de dois ou mais machos no aparelho reprodutor da fêmea para fertilizar os ovos. Segundo Thornhill & Alcock (1983), a maioria dos ovos é provavelmente fertilizada pelo esperma procedente do último macho que realizou a cópula, embora as fêmeas possam influenciar qual esperma fertilizará seus ovos (Eberhard 1996).

Uma maneira na qual os machos podem reduzir a chance de sua parceira aceitar o esperma de outro macho é formando associações pós-

acasalamento (APA) com sua parceira (Alcock 1994). Os machos podem guardar a fêmea após um acasalamento de três formas diferentes: fisicamente, mecanicamente ou quimicamente. Este comportamento visa prevenir que a fêmea copule com outros machos, por algum período de tempo, que asseguraria que seu esperma fosse utilizado para fertilizar os ovos em lugar do esperma de um macho competidor (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 sendo um esforço dos mesmos para fertilizar o maior número de ovos possíveis 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.

O comportamento sexual dos insetos pode ser dividido nas seguintes fases, sucessivamente: (1) atração a longa distância ou vôo orientado por correntes de ar, (2) atração a curta distância, (3) comportamento de corte e (4) acasalamento, ou seja, transferência de espermatozóides. Essas fases podem ou não estar incluídas no comportamento sexual das diferentes espécies de insetos. Quando os adultos não se encontram próximos uns dos outros, é frequente que indivíduos de um dos sexos sejam capazes de localizar seus parceiros por meio da comunicação visual, química e/ou acústica (Lewis 1984). Usualmente, um dos sexos emite um sinal para atrair o outro sexo. Sinais químicos, especialmente, são 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 espermatozóides (Groot 2000).

## **1.4 Aproximação dos Sexos**

Quando um sinal químico atrai indivíduos de um dos sexos na espécie, este é chamado feromônio sexual. A produção e liberação do feromônio sexual de um 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 (Borden 1990). 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 estimulam o comportamento de corte e cópula. Estes sinais podem estar localizados na cutícula (hidrocarbonetos, alcoóis ou ésteres de ácidos graxos, insaturados ou não) ou podem ser produzidos por glândulas exócrinas (Lang & Foster 1976). Sinais visuais, sonoros e tácteis também podem estimular o comportamento de corte e cópula.

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 em linguagem neurofisiológica (Chapman 1998).

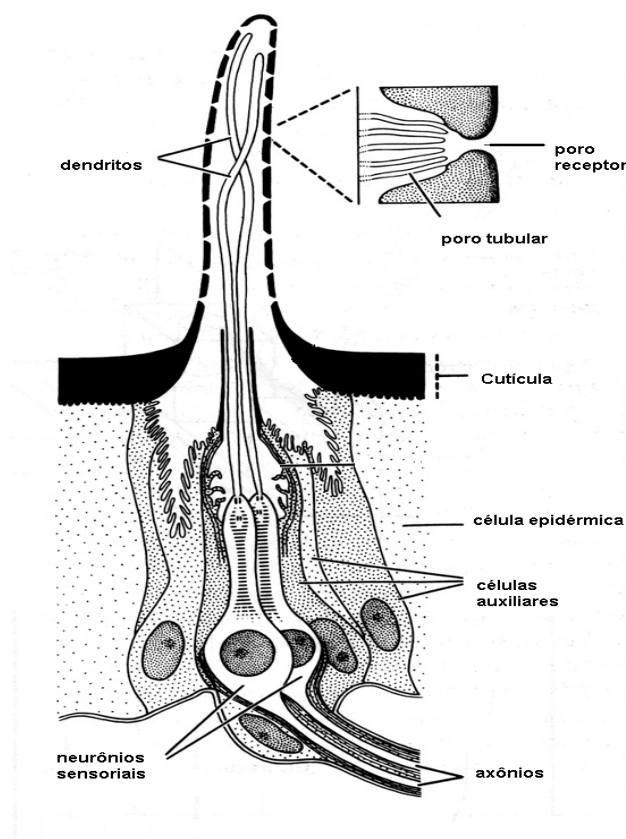
### **1.5 Mecanismos de Quimiorrecepção Olfativa**

Entre os vários grupos de animais, os insetos são, provavelmente, os que mais dependem do olfato para desempenhar suas atividades comportamentais. Os odores são muito importantes para a localização de presas, de hospedeiros e também na defesa, na seleção de plantas, na escolha de locais de oviposição, na busca de parceiro sexual, em processos de corte e acasalamento, na organização das atividades sociais e em diversos outros tipos de comportamento (Birch & Haynes 1982).

A antena dos insetos é o principal órgão responsável pela percepção de odores. As moléculas de odor podem ser capturadas por pêlos olfativos ou sensilas. Estes órgãos sensoriais possuem um ou vários neurônios associados a uma estrutura cuticular que contém um grande número de pequenos poros. Através deles as moléculas a serem detectadas penetram nos poros, passam à linfa da sensila e, após serem transportados por proteínas solúveis ligadoras de odor, estimulam receptores na membrana

dos dendritos (Nation 2002). Cada sensila olfativa contém uma ou mais células receptoras e três células auxiliares, as chamadas células tricogênicas, tormogênicas e tecogênicas. As sensilas olfativas podem apresentar diferentes formas, mas todas elas têm em comum múltiplos poros distribuídos em sua superfície (Figura 2).

A transdução da mensagem química ocorre quando a molécula de odor migra para o poro tubular por difusão e se liga nas proteínas de ligação que vão transportar as moléculas de odor até a membrana dos dendritos. Nos dendritos, as moléculas de odor serão reconhecidas por proteínas receptoras. A conformação da proteína receptora é alterada pela ligação da molécula de odor, levando à abertura de canais de  $\text{Na}^+$  na membrana da célula nervosa e desencadeando potenciais de ação que vão conduzir a informação ao sistema nervoso central (Chapman 1998).



**Figura 2.** Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto (modificado de Chapman 1998).



As substâncias químicas relevantes na obtenção de informações pelos organismos são denominadas *infoquímicos* (Dicke & Sabelis 1988). O termo *infoquímico* pode ser definido como “uma substância química que fornece informação na interação entre dois indivíduos, provocando um comportamento ou resposta fisiológica específica”. Os infoquímicos podem ser classificados com base no tipo de interação. Se a interação é intraespecífica denominam-se feromônios. Se a interação ocorre entre dois indivíduos de espécies diferentes, os infoquímicos são denominados *aleloquímicos* (Price et al. 1980).

### **1.6 Cromatografia Gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (CG-EAD)**

A eletroantenografia (EAG) é uma técnica muito utilizada para a identificação de voláteis percebidos pelas antenas dos insetos. Este método é baseado na descoberta de Schneider (1957a) que registrou pequenas flutuações de voltagem entre a ponta e a base de uma antena quando esta estava sendo estimulada com feromônio. Schneider (1957b) foi o pioneiro na técnica de EAG e, estudando a eletrofisiologia do sistema olfativo de *Bombyx mori*, revelou que o potencial de recepção do inseto frente ao seu feromônio poderia ser registrado utilizando-se uma antena isolada, posicionada entre dois microeletrodos capilares conectados a um amplificador e a um registrador.

Subsequentemente, a técnica do EAG mostrou-se eficiente em estudos de insetos de várias ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Trichoptera (Roelofs 1984, Jewett et al. 1996). Schneider (1963) sugeriu que os sinais registrados através da EAG são essencialmente a soma dos potenciais dos receptores olfativos registrados mais ou menos simultaneamente por um eletrodo. Posteriormente, Schneider (1969) interpretou os sinais negativos destas pequenas reações elétricas dos dendritos nas células olfativas como uma despolarização da membrana do receptor. A amplitude da resposta que corresponde à frequência do impulso nervoso gerado aumenta com o

aumento da concentração do estímulo químico até o nível de saturação ser atingido. Até que finalmente, Kaissling e Thorson (1980) resumiram informações de aspectos estruturais, químicos e elétricos das sensilas olfativas para eletroantenogramas.

Em geral, a sensibilidade e a especificidade de uma antena frente aos componentes do feromônio fazem do EAG uma poderosa ferramenta para análise de componentes de feromônios e para a confirmação de suas estruturas. Porém, quando o EAG é utilizado isoladamente, sem um método de purificação, como por exemplo, a cromatografia gasosa (CG), não apresenta grandes vantagens, pois não é possível especificar quais os componentes que afetam as respostas e, além disso, pode-se não detectar possíveis componentes minoritários do feromônio.

A técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Eletroantenodeteccção (CG-EAD) foi primeiramente relatada por Moorhouse et al (1969) como sendo um método extremamente eficaz para a detecção de componentes de feromônios, uma vez que estaria aliada à especificidade e sensibilidade da eletroantenografia à capacidade analítica e de separação do cromatógrafo. Utilizando-se esta nova tecnologia, por meio de uma simples análise do extrato bruto, pode-se determinar com precisão, quais compostos de uma mistura são biologicamente ativos.

Uma amostra de odor, após ser injetada e vaporizada pela alta temperatura da porta de injeção do CG, percorre toda a coluna cromatográfica, onde acontece a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que sai da coluna é dividido em dois, sendo que uma parte vai para o detector de ionização de chama (FID) e, conseqüentemente gera um perfil cromatográfico, e a outra parte vai para a antena, onde possíveis respostas a cada odor serão amplificadas. Assim, obtendo-se duas detecções simultâneas, é possível saber se o composto registrado é biologicamente ativo ou não. A separação dos compostos presentes em uma amostra ocorre em diferentes tempos, dependendo da sua volatilidade. O tempo de retenção de um composto pode ser definido como o tempo transcorrido entre a injeção da amostra e a sua passagem pelo detector. É importante que a temperatura da coluna seja

rigorosamente controlada, para assegurar a reprodutibilidade das análises. Normalmente, utiliza-se uma programação linear de temperatura, por meio da qual a temperatura da coluna vai sendo aumentada gradualmente durante a análise.

## **1.7 Olfatometria**

A técnica de olfatometria permite avaliar respostas de orientação dos insetos confrontados com fonte de odor utilizando correntes de ar (Carde & Baker 1984). Bioensaios que permitam demonstrar o envolvimento de substâncias químicas na orientação e comunicação dos insetos 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 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 utilizam-se do vento para se orientar até as fontes de odor. Quando o inseto se orienta 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 turbulência, onde o processo de formação de gradiente de odor é lento e dominado por processos de difusão. Em ambientes com correntes de ar, frequentemente há turbulência, o que impede 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. A orientação dos insetos nestes ambientes é o resultado de uma mistura de reações quiomiotáticas, optomotoras e anemotáticas. (Miller & Roelofs 1978, Murlis et al. 2000).

### **1.8 Comunicação Química em Triatomíneos**

Em triatomíneos, o uso de infoquímicos pode estar relacionado com o reconhecimento e localização de hospedeiros, com o encontro de possíveis parceiros para o acasalamento, com a defesa e alarme, assim como com o comportamento de agregação e busca de abrigos (Schofield & Patterson 1977, Núñez 1987, Lorenzo Figueiras et al. 1994, Manrique & Lazzari 1995, Lorenzo & Lazzari 1996, Taneja & Guerin 1995, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998).

Estes insetos demonstram uma resposta anemotática positiva, ou seja, orientam-se contra correntes de ar, quando confrontados com correntes que carregam certos odores associados ao hospedeiro (Núñez 1982, 1987, Taneja & Guerin 1995, 1997, Barrozo 2003, Barrozo 2004, Barrozo et al. 2004). Atração ao CO<sub>2</sub> foi demonstrada em *Rhodnius prolixus* (Núñez 1982, Taneja & Guerin 1995) e *T. infestans* (Taneja & Guerin 1995, 1997, Barrozo et al. 2003, Barrozo et al. 2004). A atração de *Triatoma 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 e/ou nonanal eram capazes de modificar o comportamento de *T. infestans*. Barrozo (2003) mostrou através de eletroantenografia que antenas de *T. infestans* apresentam respostas eletrofisiológicas ao ácido láctico, 1-octen-3-ol e ácidos graxos, sendo estas respostas dose dependentes. Além disso, a autora demonstrou a existência de anemotaxia negativa 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).

Os triatomíneos apresentam dois pares de glândulas exócrinas produtoras de voláteis, as glândulas metasternais localizadas no metatórax ventral e as glândulas de Brindley situadas no metatórax dorsolateral. Além disso, áreas glandulares associadas com a genitália de machos foram descritas para *Triatoma rubrovaria* indicando que provavelmente possam estar envolvidas na produção de substâncias (Weirauch 2003). Estas glândulas estão ausentes em ninfas e este grupo não parece ter outro tipo de glândula tal como as glândulas abdominais e ventrais encontradas em outros Reduviidae (Kalin & Barret 1975; Schofield 1979; Rossiter & Staddon, 1983). Os triatomíneos utilizam, aparentemente, substâncias químicas como mecanismo de defesa. Quando estes insetos são perturbados liberam um odor característico das glândulas de Brindley. O principal componente deste odor, o ácido isobutírico, quando aplicado topicamente em ninfas de *R. prolixus*, causa paralisação nos insetos (Kalin & Barret 1975). Barret (1976) sugeriu que o ácido isobutírico também funcionaria como feromônio de alarme. Kalin & Barret (1975) obtiveram evidências de que esse composto teria essa função quando testaram a resposta de adultos de *R. prolixus* ao ácido isobutírico em olfatômetros e observaram rápida dispersão dos insetos e ruptura do equilíbrio de agregação. Schofield (1979) observou que baixas concentrações de ácido isobutírico atraíam adultos de *R. prolixus*, enquanto altas concentrações os repeliam. Uma função de defesa foi sugerida também para o 3-metil-2-hexanona, único composto identificado na secreção das glândulas metasternais de *Dipetalogaster maximus* (Ward 1981, Rossiter & Staddon 1983, Manrique et al. 2006).

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 2002b, Vitta et al. 2002, 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 de contato direto. Diferentes autores demonstraram respostas de agregação interespecífica promovidas por sinais presentes nas fezes e na cutícula de ninfas e adultos de várias espécies de triatomíneos (Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002a, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002b, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2006).

Vários trabalhos sugerem o uso de sinais químicos no contexto sexual em triatomíneos (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1995, De Brito Sánchez et al. 1995, Manrique et al. 2006, Pontes et al. 2007). Os estudos de comportamento sexual, tanto em *T.infestans* quanto em *R.prolixus*, sugerem que existe um sinal químico emitido durante a cópula por um ou ambos os sexos, que promove a agregação de machos em torno do casal em cópula (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1995). Manrique et al. (2006) e Pontes et al. (2007) demonstraram que a secreção das glândulas metasternais está envolvida no contexto sexual de *T. infestans* e *R. prolixus*, respectivamente. No entanto, pouco se sabe sobre a existência de sinais olfativos capazes promoverem a orientação a distância entre adultos de triatomíneos.

O estudo do comportamento e a análise funcional das estruturas sensoriais são indispensáveis para compreender a maneira com que estes insetos lidam com atividades fundamentais, como a procura de alimento, de parceiro para reprodução e de abrigo.

## OBJETIVOS

---

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

A partir do que foi exposto e levando-se em consideração que a transmissão da doença de Chagas é controlada principalmente através do combate ao vetor, o objetivo deste projeto é identificar feromônio(s) sexual(is) de *T. brasiliensis*, na tentativa de contribuir para o desenvolvimento de armadilhas utilizando iscas químicas capazes de atrair adultos desta espécie. O presente projeto abrange cinco aspectos: **(1)** um estudo do uso do abrigo por adultos de *T. brasiliensis*, **(2)** um estudo dos sinais químicos que desencadeiam o vôo nesta espécie, **(3)** um estudo da comunicação por odor entre os sexos através da olfatosmetria, **(4)** um estudo da identificação química do feromônio sexual e uma análise eletrofisiológica das respostas do sistema olfativo frente a esses compostos e finalmente **(5)** um estudo descritivo do comportamento sexual de *T. brasiliensis*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Analisar o padrão de atividade locomotora em relação ao abrigo (número de saídas do abrigo e número de passagens nas proximidades do abrigo) por adultos de *T. brasiliensis* durante as primeiras horas da fase escura do ciclo diário e verificar o efeito da presença de odores emitidos por insetos do sexo oposto na intensidade desta atividade;
2. Avaliar a atividade de início de voo em adultos de *T. brasiliensis* estimulados por correntes de ar associadas com odor de indivíduos do sexo oposto.
3. Avaliar orientação em adultos de *T. brasiliensis* estimulados por correntes de ar associadas com odores de adultos coespecíficos, utilizando um olfatômetro em "T".
4. Avaliar a relevância da secreção das glândulas metasternais e de Brindley no sucesso da cópula em *T. brasiliensis*.
5. Identificar os compostos produzidos pelas glândulas metasternais de adultos de *T. brasiliensis*.



6. Avaliar se a secreção das glândulas metasternais afeta as respostas de orientação de machos *T. brasiliensis*, utilizando um olfatômetro em "T".
7. Testar se os odores produzidos pelas glândulas metasternais de fêmeas de *T. brasiliensis* promovem respostas nos órgãos olfativos de machos por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenodeteção (CG-EAD).
8. Verificar a ocorrência de mecanismos de comunicação química que intercedem o reconhecimento entre indivíduos de diferentes sexos em *T. brasiliensis*.
9. Caracterizar o comportamento sexual e sua maturação em *T. brasiliensis*.

## REVISÃO DA LITERATURA

---

### **3 Revisão da Literatura**

#### **3.1 Uso de abrigos por adultos de *Triatoma brasiliensis***

Durante as horas do dia, os triatomíneos desenvolvem pouca atividade e são comumente encontrados em um estado de imobilidade ou em *akinesis* no interior dos abrigos (Wigglesworth & Gillet 1934). O comportamento de *akinesis* é controlado por indicadores externos, que podem ser um feromônio de agregação ou uma estimulação tátil no coespecífico e no substrato. (Lorenzo Figueiras & Lazzari 2000). Sabe-se que o ritmo circadiano de atividade locomotora em *T. infestans* apresenta um padrão bimodal com um pico de atividade ocorrendo no anoitecer e outro no amanhecer (Settembrini 1984, Lazzari 1992, Lorenzo & Lazzari, 1998). A entrada destes insetos no abrigo é promovida pela sua intensa fototaxia negativa (evitar luz), entretanto outros fatores também exercem influência na escolha do abrigo, como por exemplo, a umidade relativa do ambiente, a presença de sinais químicos e a densidade populacional (Lorenzo & Lazzari 1996, Reisenman et al. 1998, Lorenzo & Lazzari 1999, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Mota 2006, Thierry et al. 2006, Vitta et al. 2007). Particularmente ao amanhecer, quando a intensidade de luz aumenta, os triatomíneos buscam proteção e nesse contexto as suas fezes atuam como marca química de orientação aos abrigos (Lorenzo & Lazzari 1996, 1998). Alguns autores observaram uma maior tendência de *T. infestans* e *T. brasiliensis* em defecar nos acessos do abrigo e demonstraram uma preferência destas espécies por abrigo associado a fezes (Lorenzo & Lazzari 1996, Vitta et al. 2007). Uma vez no interior dos abrigos, a agregação de triatomíneos é mediada por sinais químicos de contato (Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2002). Estes fatores estão presentes na cutícula, são depositados no substrato através do contato físico dos insetos e atuam como uma pegada química.

A atividade de saída do abrigo nas primeiras horas da escotofase está relacionada com a busca de alimento (Lorenzo & Lazzari 1998, Guerenstein & Lazzari 2008). Uma vez fora dos abrigos, sabe-se que odores do hospedeiro modulam o processo de localização das fontes de

alimento (Núñez 1982, Guerenstein & Guerin 2001, Barrozo & Lazzari 2003, Barrozo & Lazzari 2004a, 2004b, Barrozo et al., 2004 ). Barrozo et al. (2004) e Bodin et al. (2008) demonstraram em *T. infestans* e *R. prolixus* que o ritmo de resposta comportamental aos odores provenientes do hospedeiro é controlado por um relógio endógeno circadiano e que esta resposta ocorre com maior intensidade somente durante as primeiras horas da fase escura do ciclo diário. Por outro lado, a resposta olfatória ao feromônio de agregação das fezes em *R. prolixus* é restrita ao início da fase clara e parece não ser controlada por um relógio endógeno, mas por uma influência direta de variáveis externas, como por exemplo, pelo ciclo de luz ambiental (Bodin et al. 2008).

No contexto sexual, os triatomíneos devem apresentar maneiras especiais de encontrar seu parceiro para o acasalamento, porém, pouco se sabe sobre a existência de mecanismos de orientação envolvidos neste processo de comunicação. Vários trabalhos mostram que odores liberados por casais em cópula são capazes de promover a agregação de outros machos (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1994, De Brito Sánchez et al. 1995). Além disso, Pontes et al. (2008) sugerem o uso de sinais químicos no reconhecimento de parceiro a curta distância em triatomíneos. No entanto, pouco se sabe sobre os sinais envolvidos na localização de parceiro a longa distância por estes insetos.

O abrigo parece ser um recurso fundamental para a sobrevivência destes insetos, uma vez que quando um abrigo é oferecido dentro de uma arena, grande parte dos insetos presentes entra em *akinesis* no seu interior (Lorenzo & Lazzari 1998, Mota 2007). Além disso, observações de campo mostram que os triatomíneos são comumente encontrados no interior de frestas em paredes, pedras ou madeiras. Nas espécies estudadas, a saída dos abrigos acontece somente após o início da fase escura (Lorenzo & Lazzari 1998, Ferreira 2009). Neste sentido, torna-se necessário entender como os adultos de *T. brasiliensis* fazem uso do abrigo e como estes insetos, ao encontrar um abrigo seguro, se orientam a procura de parceiros para a reprodução. Particularmente, faz-se necessário avaliar se a atividade de saída dos abrigos de machos e fêmeas

está relacionada com a busca por parceiro sexual e verificar se esta atividade ocorre em uma janela temporal específica do ciclo diário.

Baseado no fato de que várias espécies de triatomíneos apresentam uma marcante organização circadiana para muitas atividades, tais como, postura de ovos, ecdise, oviposição, termopreferência, sensibilidade visual e atividade locomotora (Ampleford and Steel 1982, Constantinou 1984, Lazzari 1991, 1992, Minoli and Lazzari 2003, Reisenman et al. 1998, 2002), os objetivos deste trabalho foram analisar o padrão de atividade locomotora em relação ao abrigo em adultos de *T. brasiliensis* durante as horas de escuridão do ciclo diário e verificar o efeito da presença de indivíduos do sexo oposto nesta atividade.

### **3.2 Início da atividade de voo em machos de *Triatoma brasiliensis* mediado por odor de fêmea**

Populações domésticas de *T. brasiliensis* podem ser facilmente eliminadas pela aspersão de inseticidas piretroides nas casas infestadas, porém, o risco de reinfestação permanece através de insetos provenientes de focos não tratados e do ambiente silvestre (Silveira & Vinhaes 1998). A dispersão destes insetos frequentemente se dá de forma passiva, como por exemplo, por meio de roupas e utensílios de viajantes que se deslocam entre diferentes localidades. No entanto, adultos de *T. brasiliensis* também podem dispersar-se ativamente através do voo (Carbajal et al 2007). Durante a metamorfose dos triatomíneos, o desenvolvimento da capacidade de voar é decorrente de alterações morfológicas das estruturas envolvidas nesta atividade (Ward et al. 1982, Scaraffia et al. 1997). O estudo dos músculos torácicos de ninfas de quinto estágio e adultos de *Dipetalogaster maximus* e *Triatoma infestans* mostrou mudanças no perfil de expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas nas vias produtoras de energia nos músculos de voo. Além disso, o tamanho e o número de mitocôndrias nos músculos de voo em adultos aumentam quando comparados com aqueles das ninfas de quinto estágio, indicando que a sua atividade respiratória é maior (Scaraffia et al. 1997). Estas alterações bioquímicas e morfológicas que

ocorrem nos músculos torácicos durante a muda imaginal parecem ser essenciais para a aquisição da capacidade de voar.

A dispersão ativa dos triatomíneos mediante o voo parece ser afetada pelo seu estado nutricional (Lehane et al. 1992, McEwen & Lehane 1993), pela temperatura (Lehane & Schofield 1982, Lehane et al. 1992) e pelo estado reprodutivo (McEwen & Lehane 1994). A atividade de voo de *T. infestans* parece ser afetada pela temperatura, visto que, quando a temperatura ambiental aumenta acima dos 25°C, a proporção de indivíduos que iniciam o voo também aumenta (Lehane et al. 1992, Gurevitz et al. 2006). Lehane & Schofield (1982) demonstraram que o início da atividade de voo em *T. infestans* ocorre com maior frequência entre 12 e 18 dias após a alimentação como adultos. O efeito do jejum sobre o início desta atividade em *Triatoma sordida* é semelhante (McEwen & Lehane 1993).

Observou-se que adultos de *T. infestans* podem voar distâncias que variam entre 200 m e 1 km (Lehane & Schofield 1981, Schweigmann et al. 1988). Além disso, quando adultos de *T. infestans* são expostos em condições de voo na qual eles são mantidos suspensos, este insetos podem apresentar batimento de asas por mais de 20 minutos ininterruptos. De forma semelhante, adultos de *Rhodnius prolixus* também apresentam capacidade para realizar voos longos, uma vez que podem voar de maneira ininterrupta por aproximadamente duas horas (Gringorten & Friend, 1979).

Minoli & Lazzari (2006) demonstraram que *T. infestans* e *R. prolixus* iniciam sua atividade de voo de maneira direcionada, quando confrontados com fontes de luz artificial. A comparação entre estas espécies demonstrou que *R. prolixus* apresenta uma maior predisposição para voar do que *T. infestans* e que as fêmeas das duas espécies iniciam o voo com maior frequência. Armadilhas luminosas são frequentemente utilizadas no campo e em áreas endêmicas para capturar triatomíneos (Tonn et al. 1978, Schweigmann et al. 1988, Noireau et al. 2000, Noireau & Dujardin 2001, Vazquez-Prokopec et al. 2004, Carbajal et al. 2007).

Em geral, sabe-se pouco sobre os fatores que modulam a atividade de voo em triatomíneos. Até o momento, é bem conhecido que apenas o estado fisiológico (Lehane et al. 1992, McEwen et al. 1993) e a presença de fontes de luz artificial (Noireau & Dujardin 2001, Vazquez-Prokopec et al. 2004, Gurevitz et al. 2006, Minoli & Lazzari 2006, Carbajal et al. 2007) podem influenciar a atividade de voo nestes insetos.

Diversos estudos demonstraram a existência de orientação em triatomíneos por meio de sinais olfativos tais como, dióxido de carbono, ácidos graxos de cadeia curta e outros odores provenientes dos hospedeiros (Núñez 1982, Taneja & Guerin 1995, Barrozo & Lazzari 2004a, 2004b). No entanto, pelo menos em adultos de *T. infestans*, odores do hospedeiro parecem não estimular o início da atividade de voo (Gurevitz et al. 2006). Além disso, os triatomíneos também utilizam sinais químicos presentes na suas fezes e cutícula para se orientar aos abrigos e agregar no interior deles (Lorenzo & Lazzari 1996, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Cruz-López et al. 1993, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2002). Recentemente, Manrique et al. (2006) e Pontes et al. (2008) identificaram substâncias produzidas pelas glândulas metasternais (GMs) de *T. infestans* e *R. prolixus* e sugeriram o envolvimento destes compostos na comunicação entre sexos. Os autores mostraram que as substâncias produzidas por estas glândulas são emitidas espontaneamente durante a cópula (Manrique et al. 2006, Pontes et al. 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que a ocorrência de cópula em algumas espécies de triatomíneos requer a presença das substâncias emitidas pelas GMs (Crespo & Manrique 2007, Pontes et al. 2008). Está claro que os triatomíneos usam sinais olfatórios para se comunicarem, porém, até o momento não existem evidências demonstrando que pistas químicas possam estimular o início da atividade de voo nestes insetos.

A colonização de novos habitats por triatomíneos depende, entre outros fatores, da habilidade destes insetos em encontrar e seguir pistas localizadas a uma determinada distância. Os fatos relatados até aqui evidenciam o desconhecimento sobre possíveis mecanismos de orientação em triatomíneos durante a sua dispersão. Compreendê-los pode permitir o

desenvolvimento de metodologias mais eficientes para o controle dos processos de re-infestação. Neste sentido, o comportamento representa uma importante interface de interação dos organismos com seu ambiente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o início da atividade de voo em adultos de *T. brasiliensis* pode ser disparado pela presença de odores emitidos por adultos do sexo oposto.

### **3.3 Comunicação química entre sexos em *Triatoma brasiliensis* – O papel das glândulas exócrinas**

Uma característica importante na biologia dos insetos é que feromônios sexuais são comumente utilizados para localizar parceiros a distância e para promover o acasalamento (Cardé & Bell 1995, Cardé & Minks 1997). Os feromônios são vitais na comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie e as respostas dos insetos a estes compostos são robustas e estáveis. Estas substâncias são capazes de modificar o comportamento do inseto e são utilizadas com frequência no manejo e regulação de populações de insetos-praga. Feromônios sexuais responsáveis pela orientação a distância foram primeiramente descritos e quimicamente identificados em mariposas (Butenandt et al. 1959) e são atualmente utilizados para monitorar pragas agrícolas (Minks & Van Deventer 1992, Cardé & Minks 1997).

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 deste sinal olfativo, capaz 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.

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). Estas glândulas estão ausentes em ninfas e esta subfamília não parece ter



outras glândulas exócrinas tal como as glândulas abdominais e ventrais encontradas em outros heterópteros (Staddon 1979). A origem dos sinais químicos envolvidos na comunicação sexual de triatomíneos vem sendo recentemente estudada. Manrique *et al.* (2006) e Pontes *et al.* (2008), a partir de estudos comportamentais e de identificação dos constituintes das GMs de *T. infestans* e *R. prolixus*, sugeriram que estas glândulas estariam envolvidas na comunicação entre sexos (Manrique *et al.* 2006, Pontes *et al.* 2008). 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*. Adicionalmente, Pontes *et al.* (2008) demonstraram que fêmeas de *R. prolixus* emitem a secreção destas glândulas com maior frequência e que esta atividade é mais intensa na fase escura do ciclo diário. Os autores mencionados, também sugerem que esta atividade pode estar relacionada com o comportamento de chamamento de machos por parte das fêmeas.

Insetos adultos perturbados mecanicamente emitem a secreção produzida pelas glândulas de Brindley. 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, em baixas concentrações, 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. Entretanto, até o momento não há dados experimentais que comprovem a existência de comportamento desencadeado ou promovido por esta substância que tenham relação direta com o contexto sexual.

O primeiro relato de produção de substâncias voláteis pelas glândulas metasternais de triatomíneos foi apresentado por Rossiter & Staddon (1983) em *Dipetalogaster maximus*. Estes autores identificaram 3-metil-2-hexanona como o único produto presente na secreção destas glândulas. De acordo com estes autores, o composto poderia atuar na defesa contra

predadores. Entretanto, o trabalho mencionado não apresenta evidências comportamentais da ação do composto. Cruz-Lopez et al. (1995) analisaram o conteúdo das glândulas metasternais de *T. infestans* e não encontraram substâncias voláteis. Manrique et al. (2006) examinaram os compostos produzidos pelas glândulas metasternais de *T. infestans* e identificaram uma mistura de cetonas, alcoóis e um composto de estrutura desconhecida até o presente. Além disso, os autores mostraram que os compostos produzidos pelas glândulas metasternais de *T. infestans* são liberados durante a cópula, sugerindo então o envolvimento destas glândulas na comunicação sexual destes insetos. Pontes et al (2008) também elucidaram a identidade dos compostos produzidos pelas GMs de *R. prolixus* e encontraram uma mistura de cetonas e alcoóis.

Triatomíneos apresentam uma resposta anemotática característica, orientando-se contra a direção do fluxo de ar, quando confrontados com correntes de ar associadas com odores do hospedeiro (Núñez 1982, Barrozo 2003, Barrozo et al. 2004a, Barrozo et al. 2004b). Porém, mecanismos anemotáticos mediadores de processos de orientação relacionados com o contexto sexual de triatomíneos não são conhecidos.

No presente estudo, a existência de mecanismos de comunicação química a distância entre os sexos foi avaliada através da técnica de olfatometria. Esta técnica avalia, mediante testes de escolha simultânea, a orientação de insetos confrontados com corrente de ar associada a fontes de odor, permitindo assim, caracterizar mecanismos de orientação modulados por odor em insetos que se deslocam caminhando. Consequentemente, odores de adultos coespecíficos foram testados em um olfatômetro para avaliar a existência de feromônios sexuais envolvidos na comunicação de adultos de *T. brasiliensis*. O próximo passo foi determinar a origem dos sinais químicos que promoveram a orientação dos insetos. Finalmente, procuramos verificar se as glândulas metasternais e de Brindley são necessárias para a ocorrência de cópula.

### **3.4 Respostas eletrofisiológicas da antena de machos de *Triatoma brasiliensis* aos odores da glândula metasternal de fêmeas**

Adultos de triatomíneos emitem uma diversidade de substâncias químicas através de suas glândulas exócrinas (Rojas et al. 2002, Manrique et al. 2006, Pontes et al. 2008). Aparentemente, estas substâncias são utilizadas como sinais sensoriais em sua busca por parceiro para o acasalamento (ítens 1, 2 e 3 desta tese). Grande parte dos resultados apresentados no presente trabalho demonstra que machos são atraídos por odores de fêmeas (ítens 1-3) e que as glândulas metasternais estão envolvidas nesta atração (item 3). Nas glândulas metasternais de *T. infestans* e *R. prolixus* já foram identificadas mais de 20 substâncias, incluindo principalmente cetonas e alcoóis, que são utilizadas para o reconhecimento sexual entre estes insetos (Manrique et al. 2006, Crespo e Manrique 2007, Pontes et al. 2008). Pontes et al.(2008) demonstraram que adultos de *R. prolixus* emitem espontaneamente alguns compostos produzidos pelas glândulas metasternais e que a emissão em fêmeas é maior e é mais intensa na fase escura do ciclo diário, reforçando o envolvimento desta glândula na comunicação química de *R. prolixus*.

Uma das principais características dos insetos, no que diz respeito à comunicação química, é a sensibilidade e especificidade com que suas antenas percebem os componentes relevantes de misturas de infoquímicos (Steinbrecht & Schneider 1980, Kaissiling & Thorson 1980). Receptores antenais que são estimulados por substâncias voláteis, tais como L-ácido láctico, ácido pirúvico, aldeídos, ácidos graxos de cadeia curta, piridinas, furanos, terpenos e aminas foram encontrados em *T. infestans* (Bernard 1974, Taneja & Guerin 1997, Guerenstein 1999, Guerenstein & Guerin 2001, Diehl et al. 2003). Vale ressaltar que a maior parte destas respostas provavelmente está associada com a detecção de sinais da presença do hospedeiro. Em triatomíneos, Guerenstein & Guerin (2001) demonstraram que o ácido isobutírico constituía o único componente da mistura de odores de coelho capaz de estimular a sensila basicônica (GP2) localizada na antena de *T. infestans* e que o octanal e o

nonanal presentes como odores em lã de ovelha e em penas de galinha também estimulavam a GP2. Esta descoberta foi realizada a partir da separação dos voláteis presentes em uma mistura de odores de hospedeiro utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um *set-up* de eletrofisiologia para registros de sensila única. Nota-se que até o presente, nenhum trabalho mostrou resposta eletrofisiológica em antenas de triatomíneos através do sistema GC-EAD.

As antenas dos insetos são o órgão principal na percepção de odores, cujas moléculas são capturadas por pelos olfativos ou sensilas (Chapman 2006, Nation 2001). Cada componente de uma mistura de odor pode ser reconhecido por um tipo específico de neurônio sensorial nas antenas (Chapman 2006). Sabe-se que as respostas de alguns neurônios do lobo antenal aos estímulos olfativos são dependentes da dose da substância em questão.

Baseando-nos no fato de que a secreção das glândulas metasternais é relevante para o sucesso da cópula e ainda, considerando que ela é capaz de promover a orientação de machos de *T. brasiliensis*, o objetivo deste trabalho foi determinar a identidade química dos componentes da sua secreção e verificar, por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada à eletroantenodeteção (CG-EAD), quais as substâncias químicas são detectadas pela antena de machos de *T. brasiliensis*

### **3.5 Comportamento de cópula e associação pós-acasalamento em *Triatoma brasiliensis***

Os triatomíneos tornam-se aptos para a reprodução após a muda imaginal. Durante este processo algumas alterações corporais ocorrem, tais como, o aparecimento das asas, das glândulas exócrinas (glândulas de Brindley e metasternais) e o desenvolvimento do sistema reprodutor (Dumser & Davey 1974, Schofield & Upton 1978, Rossiter & Staddon 1983). Além destas alterações, alguns fatores como a idade e o estado nutricional são essenciais para que ocorra a cópula nestes insetos

hematófagos (Lima et al. 1986, Malo et al. 1993, Manrique and Lazzari 1994, Pires et al. 2004).

Em geral, os triatomíneos apresentam um comportamento simples de cópula formado por uma sequência de passos comportamentais realizados principalmente pelos machos (Rojas et al. 1990, Rojas & Cruz-López 1992, Manrique & Lazzari 1994, Pires et al. 2004). Fêmeas, quando não receptivas, podem rejeitar às tentativas de cópula executadas pelos machos através de 4 padrões comportamentais diferentes (Manrique & Lazzari 1994, Pires et al. 2004). Segundo Manrique & Lazzari (1994), as rejeições executadas pelas fêmeas nem sempre impedem a ocorrência de cópula. No entanto, os diferentes tipos de comportamentos de rejeição, a saber, achatamento contra o substrato, movimentos abdominais, fuga ou estridulação, normalmente induzem os machos a interromper suas tentativas de acasalamento.

Lima *et al.* (1986) e Pires *et al.* (2004) demonstraram que fêmeas de *P. megistus* aceitam acasalar somente uma vez e que uma segunda cópula de curta duração pode ocasionalmente ocorrer, embora seja conhecida a ocorrência de acasalamentos múltiplos em outras espécies de triatomíneos durante agregações de adultos (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1995). Davey (2007) sintetizou os conhecimentos existentes sobre a fisiologia da produção de ovos em *R. prolixus* e mostrou que tanto a alimentação quanto o acasalamento desencadeiam a oogênese e a oviposição via sistema nervoso e endócrino. A cópula e a alimentação afetam a atividade dos *corpora allata*, operando em um grupo de células neurosecretoras da *pars intercerebralis*, na espermateca e aparentemente agindo no sistema nervoso periférico.

Manrique & Lazzari (1994) mostraram que a alimentação modula o comportamento sexual de *T. infestans* promovendo uma mudança no comportamento das fêmeas. Em resposta à mudança do seu estado nutricional, as fêmeas de *T. infestans* passam a aceitar as tentativas de cópula realizadas pelos machos no período pós alimentação. Apesar disso, a relevância relativa da idade e da alimentação como fatores independentes que podem afetar este comportamento não fica clara e

merece ser estudada. Adicionalmente, é necessário determinar se fêmeas de *T. brasiliensis* aceitam cópulas sucessivas como relatado para *R. prolixus* e *T. infestans* (Baldwin et al 1971, Manrique & Lazzari 1995) e analisar se a presença de grupos de adultos promove mudanças no comportamento sexual de machos e fêmeas. Portanto, torna-se relevante avaliar o efeito da idade, da alimentação e da cópula no comportamento sexual destes insetos.

Fêmeas de *T. brasiliensis* têm longevidade de aproximadamente 245 dias e podem acasalar até 27 vezes com o mesmo macho ao longo da vida adulta (Brasileiro 1982). Manrique & Lazzari (1995) sugerem a existência de um sistema reprodutivo poliândrico em *T. infestans*, uma vez que fêmeas desta espécie podem acasalar com vários machos em um curto período de tempo. A poliândria, associada com a estocagem simultânea de espermatozoides de diferentes machos, cria a oportunidade de um processo conhecido por competição espermática (Simmons 2001). Teoricamente, é esperado que a competição espermática gere uma pressão de seleção desfavorável nos machos (Parker 1984). Esta seleção antagônica na competição espermática é prognosticada a favor de (1) adaptações de "defesa" que protegem a ejaculada dos machos contra rivais e (2) adaptações "ofensivas" que garantem a certeza da paternidade na disputa entre machos (Parker 1984). Estratégias de defesa que reduzem o risco de competição espermática incluem, o comportamento de guarda do parceiro (associações pré e pós-acasalamento) (Parker 1970b, Alcock 1994, Komdeur et al. 1999), tampões de acasalamento (Parker 1970a) e produto seminal que suprime a receptividade da fêmea impedindo o re-acasalamento e estimulando a oviposição (Clark et al. 1999, Chapman 1998). De modo inverso, mecanismos ofensivos que aumentam as chances de garantir a paternidade ao acasalar com fêmeas não virgens incluem características da genitália (Waage 1979, Otronen 1998), fluido seminal (Civetta 1999, Price et al. 1999, Chapman 1998) e comportamento de corte (Otronen 1997, Edvardsson & Arnqvist 1999) que habilitam os machos a deslocar, direta ou indiretamente, os espermatozoides previamente estocados na

espermoteca. O comportamento de guardar o parceiro, que pode aumentar a certeza de paternidade dos machos, é comumente observado em insetos (Thornhill & Alcock 1983, Alcock 1994, Simmons 2001). Em triatomíneos, casais de *Triatoma mazzottii* e *P. megistus* podem apresentar associações pós-acasalamento (Rojas et al. 1990, Pires et al. 2004), no entanto, estas descrições foram incompletas e preliminares.

Neste estudo, o comportamento sexual de *T. brasiliensis* foi detalhadamente descrito. Para possibilitar uma análise comparativa, trabalhamos com a mesma nomenclatura empregada por autores prévios (Lima et al. 1986, Rojas et al. 1990, Manrique & Lazzari 1998, Pires et al. 2004). Baseando-nos na hipótese de que o uso e a produção de um feromônio sexual coincidem com a receptividade da fêmea e/ou do macho, um dos aspectos deste estudo foi investigar os fatores que influenciam a maturidade sexual e o comportamento de cópula em *T. brasiliensis*. Além disso, avaliamos se fêmeas de *T. brasiliensis* acasalam com vários machos em um curto intervalo de tempo, como relatado para *R. prolixus* (Baldwin et al. 1971) e *T. infestans* (Manrique and Lazzari 1994). Finalmente, analisamos a influência da presença de vários machos na duração e na frequência de cópula.

## MATERIAL E MÉTODOS

---



## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Uso de abrigos por adultos de *Triatoma brasiliensis***

#### 4.1.1 Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram obtidos de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou. Os insetos foram criados em frascos de acrílico cilíndrico com base de 15 cm de diâmetro, altura de 20 cm e fundo forrado com papel de filtro. Dentro de cada frasco foi colocada uma tira de cartolina dobrada em forma de sanfona para aumentar a superfície interna. Os frascos foram fechados com tecido de algodão através do qual os triatomíneos podiam picar seus hospedeiros. Os insetos foram alimentados semanalmente em camundongos suíços (*Mus musculus*) e galinhas (*Gallus gallus*), de maneira alternada. Os exemplares utilizados nos experimentos foram separados por sexo antes da muda imaginal, de acordo com a técnica de Espínola (1966). Uma vez separados, os animais foram mantidos em fotoperíodo de 12:12 L/E a  $27 \pm 1$  °C e  $64 \pm 10$  % de umidade relativa (UR). Em todos os experimentos foram utilizados adultos virgens com idade de  $29 \pm 1$  dias e jejum de 7 dias.

#### 4.1.2 Desenho Experimental

Buscamos avaliar a atividade de saída do abrigo e a atividade locomotora em torno do mesmo em adultos de *T. brasiliensis*. Estes parâmetros foram avaliados na ausência e na presença de odores emitidos por indivíduos do sexo oposto. Foi utilizada uma arena de vidro de 40 x 40 x 20 cm cujo substrato foi coberto com papel Kraft. Um abrigo artificial colocado no centro da arena foi oferecido aos insetos (Figura 3). Foram utilizados abrigos artificiais de papelão corrugado de 20 x 10 cm, dobrados ao meio de forma a gerar um abrigo de 10 cm<sup>2</sup> com duas fendas laterais de aproximadamente 0,5 cm de altura (Lorenzo & Lazzari 1996). Este abrigo é adequado para os triatomíneos, uma vez que estes insetos possuem marcante tigmotaxia e fototaxia negativa.

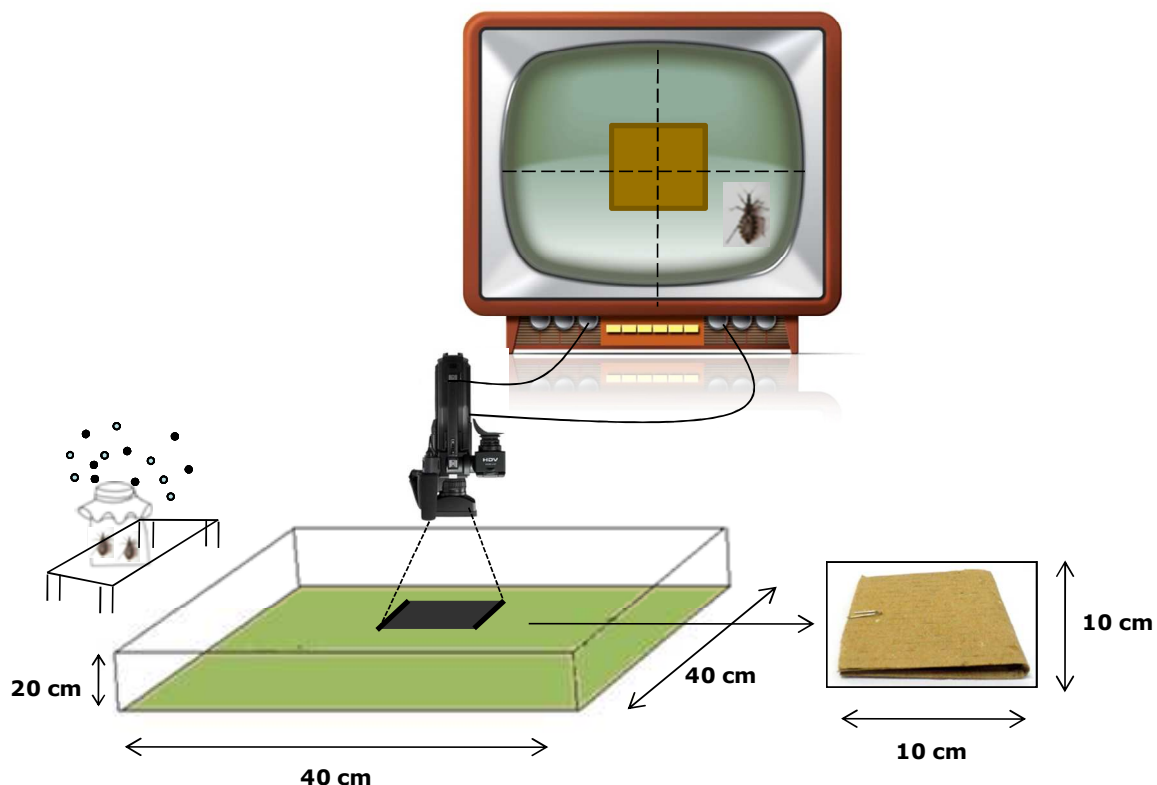
Foram realizadas duas séries experimentais para cada sexo, cada

uma com 10 ensaios. Em cada ensaio da primeira série foi avaliado o comportamento de 20 fêmeas na ausência de sinais olfativos emitidos por machos. Na segunda série, o comportamento das mesmas fêmeas foi avaliado na presença de odores emitidos por um grupo de 10 machos colocados do lado de fora da arena. Na terceira série foi avaliado o comportamento de 20 machos na ausência de sinais olfativos emitidos por fêmeas. Finalmente, na quarta série foi avaliado o comportamento dos mesmos machos na presença de odores emitidos por um grupo de 10 fêmeas colocadas do lado de fora da arena.

Os insetos utilizados como fonte de estímulos olfativos foram colocados dentro de recipientes fechados com tule na sua embocadura. Desta maneira, os odores liberados pelos insetos do sexo oposto difundiam-se pelo ambiente. Os recipientes foram posicionados a uma distância de 20 cm da arena e numa altura de 30 cm (Figura 3).

A arena foi colocada no interior de uma câmara experimental de 100 x 50 x 50 cm, cuja temperatura e umidade foram monitoradas ( $27 \pm 1$  °C e  $64 \pm 10$  % de UR). Esta câmara foi mantida sob ciclo de iluminação 12:12 L/E controlado por um temporizador. Em cada ensaio, um grupo de 20 insetos foi liberado na arena três dias antes do início do teste para permitir a sua aclimação no ambiente. Um dia antes de liberá-los, os insetos foram marcados com tinta branca para permitir a sua individualização durante os registros de vídeo. No final do período de três dias, aproximadamente 90% dos insetos haviam entrado no abrigo. Antes do início dos ensaios da primeira e terceira série, um recipiente vazio (estímulo controle) foi colocado a 30 cm de altura do lado de fora da arena experimental. Após a introdução do frasco era iniciada uma filmagem para permitir o posterior registro dos diversos parâmetros estudados. No dia seguinte e no mesmo horário, 10 indivíduos do sexo oposto (estímulo teste) foram colocados no recipiente fora da arena, na mesma posição mencionada acima. O comportamento dos insetos presentes na arena foi registrado através do uso de uma filmadora (Panasonic DVC30, 3CCD, Japão). A imagem de vídeo projetada no monitor de televisão mostrava o abrigo no centro e suas adjacências até

10 cm a cada lado, de maneira que o registro da atividade dos insetos pudesse ser realizado em uma área aproximadamente 9 vezes maior à do abrigo (Figura 3).



**Figura 3.** Desenho experimental para o estudo da atividade de triatomíneos associados a um abrigo artificial. À direita, um detalhe do abrigo artificial de papelão corrugado.

O registro da atividade dos insetos começava no final do terceiro dia, aproximadamente duas horas antes do início da fase escura e prosseguia pelas quatro primeiras horas da escotofase, totalizando 6 horas de duração. O tempo de registro foi estabelecido através de ensaios preliminares.

Para verificar a influência da presença de indivíduos do sexo oposto na atividade de saída e entrada do abrigo e na locomoção de adultos de *T. brasiliensis*, os seguintes parâmetros foram analisados:

- a) número de insetos que saíram do abrigo,
- b) atividade locomotora,

c) número de insetos que entraram no abrigo,

Todos estes parâmetros foram registrados continuamente e agrupados para cada hora de ensaio. Desta forma, foi possível delinear as variações registradas durante o período estudado. A atividade locomotora foi mensurada traçando sobre a imagem do monitor de TV um par de eixos ortogonais centralizados na tela e quantificando, através de um cronômetro, cada vez que um indivíduo cruzava qualquer uma das linhas da tela (Figura 3). Por saída do abrigo considerou-se aqueles indivíduos que se colocaram para fora do abrigo utilizando o corpo inteiro e por entrada aqueles indivíduos que se colocaram para dentro do abrigo também utilizando o corpo inteiro.

Outro parâmetro analisado durante o registro dos experimentos foi o número de tentativas de cópula realizado pelos machos na ausência e na presença de sinais olfativos liberados por fêmeas.

#### 4.1.3 Análise estatística

Para avaliar o número médio total de insetos que saíram do abrigo na ausência ou presença de odores do sexo oposto, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras pareadas com limite discriminante de  $p < 0,05$ . Adicionalmente, a atividade locomotora média total de cada sexo na ausência ou na presença de odores do sexo oposto também foi comparada por meio do mesmo teste. Finalmente, o teste *t* de Student para amostras pareadas também foi utilizado para comparar o número médio total de tentativas de cópula apresentadas pelos machos na presença de odor de fêmea e o observado na ausência do mesmo.

O nível basal de saídas e de atividade locomotora apresentado por fêmeas e machos na ausência de estímulos olfatórios do sexo oposto foi comparado através do teste *t* de Student para amostras independentes com limite discriminante  $p < 0,05$ .

Para avaliar uma possível variação dos parâmetros estudados ao longo do período experimental foi utilizada uma ANOVA de medidas repetidas de um fator com limite discriminante de  $P < 0,05$ . Contrastes *a posteriori* foram realizados mediante o teste de Tukey.

## **4.2 Início da atividade de voo em machos de *Triatoma brasiliensis* mediado por odor de fêmea**

### 4.2.1 Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram obtidos de uma colônia mantida no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Os insetos foram separados por sexo antes da muda imaginal, de acordo com a técnica de Espínola (1966), e mantidos em fotoperíodo de 12:12 L/E a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $64\pm 10\%$  de umidade relativa (UR). Os triatomíneos foram alimentados semanalmente em camundongos suíços (*Mus musculus*) ou em galinhas (*Gallus gallus*), alternadamente. Em todos os experimentos foram utilizados insetos adultos virgens de 30 dias de idade e 12 dias de jejum.

### 4.2.2 Desenho Experimental

Uma caixa de acrílico de 1 m x 50 cm x 50 cm foi utilizada para analisar a ativação e orientação dos insetos durante o início da atividade de voo (Figura 4A, 5 e 6). As duas faces opostas do eixo longitudinal da caixa foram fechadas com tela para permitir a passagem de ar. No centro da caixa foi colocada uma arena experimental circular de vidro de 10 cm de diâmetro e paredes com 10 cm de altura. No centro desta arena foi fixado verticalmente um bastão de madeira (2 cm de diâmetro e 25 cm de altura), de forma que o topo do bastão pudesse funcionar como plataforma de voo para os insetos. Vale ressaltar que ao ser estimulado pela corrente de ar os insetos sempre iniciavam o voo nesta posição (Figura 4B, 5 e 6).

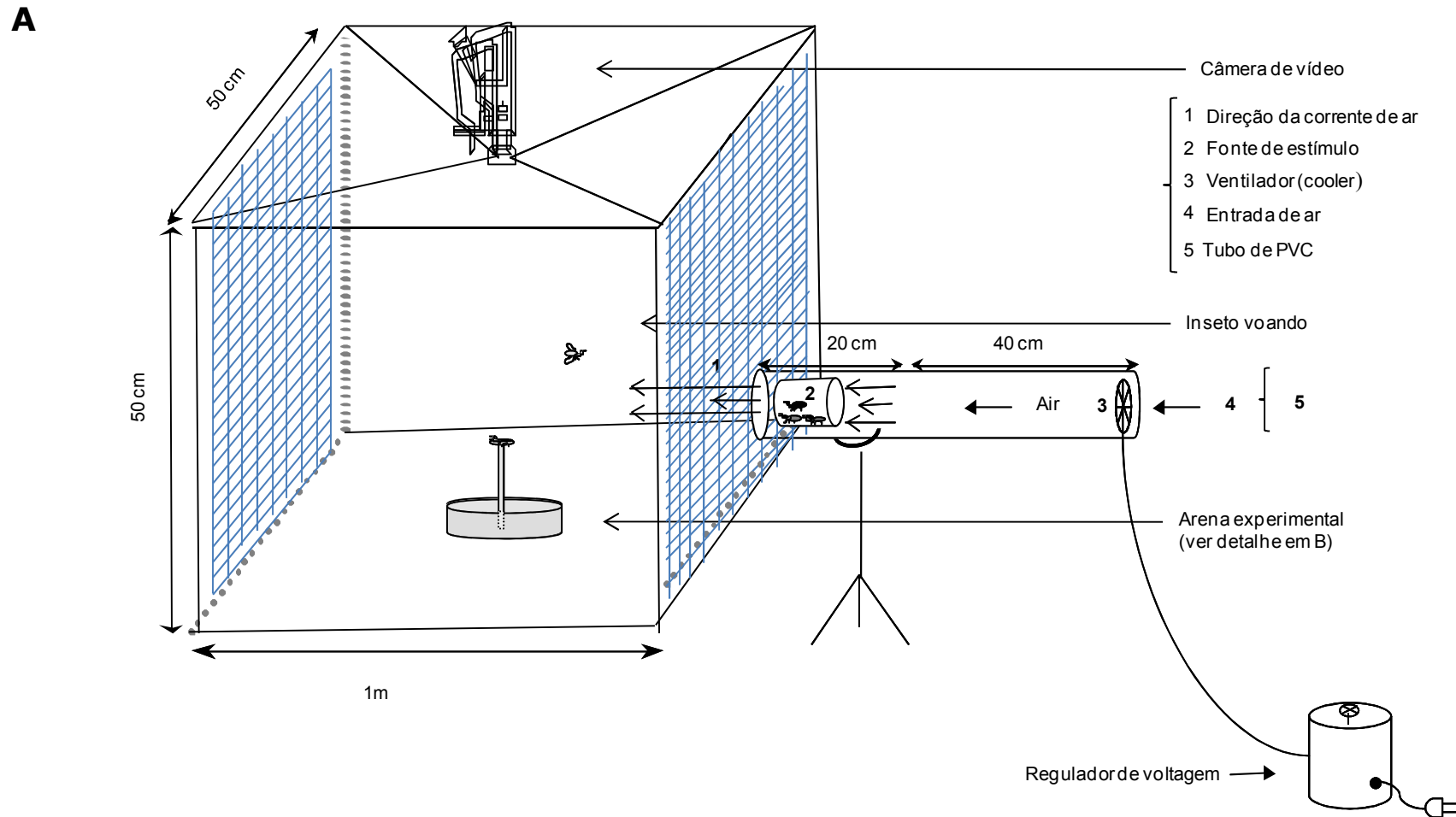
Os insetos testados foram estimulados com sinais olfativos provenientes de adultos coespecíficos do sexo oposto. O sistema de estimulação apresentava uma corrente de ar gerada por um ventilador elétrico fixado no centro de um tubo PVC de 60 cm (7,5 cm de diâmetro interno), que por sucção forçava o ar do ambiente a entrar pelo tubo sequestrando as partículas de odor presentes no recipiente (6 cm de

diâmetro e 8 cm altura) que continha o estímulo a ser testado (insetos vivos). A corrente de ar gerada no interior do tubo carregava as moléculas de odor para dentro da caixa de voo (Figura 4A, 5 e 6). A taxa de rotação do ventilador foi controlada usando um regulador de voltagem. Desta forma, foi possível gerar um fluxo de ar com velocidade média controlada e estável de  $11 \pm 1$  cm/s. A velocidade da corrente de ar foi mensurada com o auxílio de um anemômetro (Testo 405-V1, Alemanha), cujo sensor foi posicionado no topo do bastão de madeira durante as medições. O local escolhido para tal fim foi aquele onde os insetos iniciavam o voo após entrar em contato com a corrente de ar. A fonte do estímulo foi mantida a 50 cm de distância da arena e na mesma altura do extremo da plataforma de voo.

Todos os ensaios foram realizados utilizando grupos de 10 adultos do mesmo sexo colocados previamente dentro da arena circular. Os insetos foram liberados no início de cada ensaio e podiam caminhar livremente no interior da mesma e subir pelo bastão de madeira. Nestas condições, o voo era o único comportamento que podia permitir a saída dos triatomíneos desta arena. O comportamento dos insetos foi registrado através de uma filmadora de vídeo (Panasonic, DVC-30, 3CCD, Japão) conectada a um gravador de vídeo cassetes (Samsung SLV-960, Japão) do tipo Time Lapse.

Foram realizadas as seguintes séries experimentais: a) início da atividade de voo de machos estimulados com correntes de ar limpo, b) início da atividade de voo de machos estimulados com correntes de ar associadas a odor de macho, c) início da atividade de voo de machos estimulados com correntes de ar associadas a odor de fêmea, d) início da atividade de voo de fêmeas estimuladas com correntes de ar limpo, e) início da atividade de voo de fêmeas estimuladas com correntes de ar associadas a odor de fêmea e, f) início da atividade de voo de fêmeas estimuladas com correntes de ar associadas a odor de macho. Em todos os casos, 10 fêmeas ou 10 machos foram utilizados como fonte de odor para estimulação. Os ensaios controle com ar limpo foram realizados para

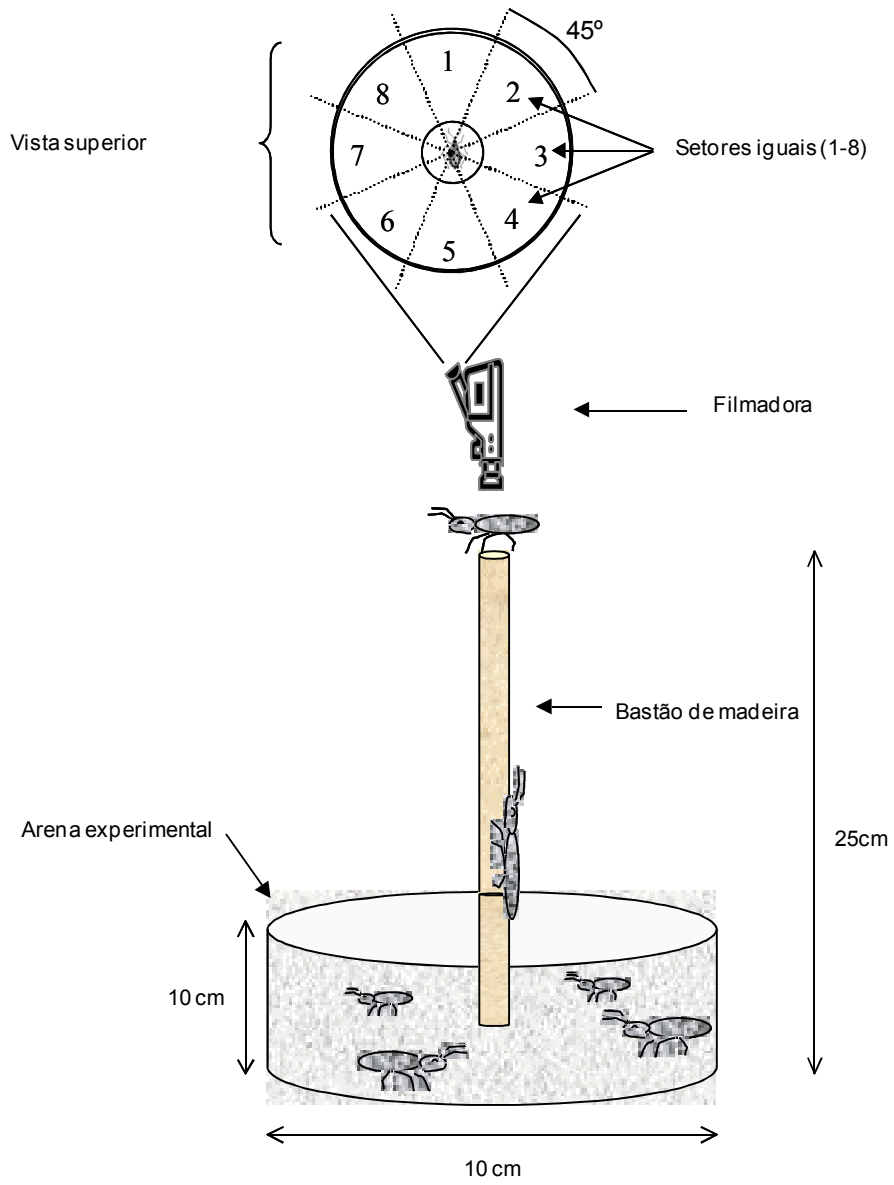
determinar a atividade basal de início de voo de cada sexo, até o momento desconhecida.

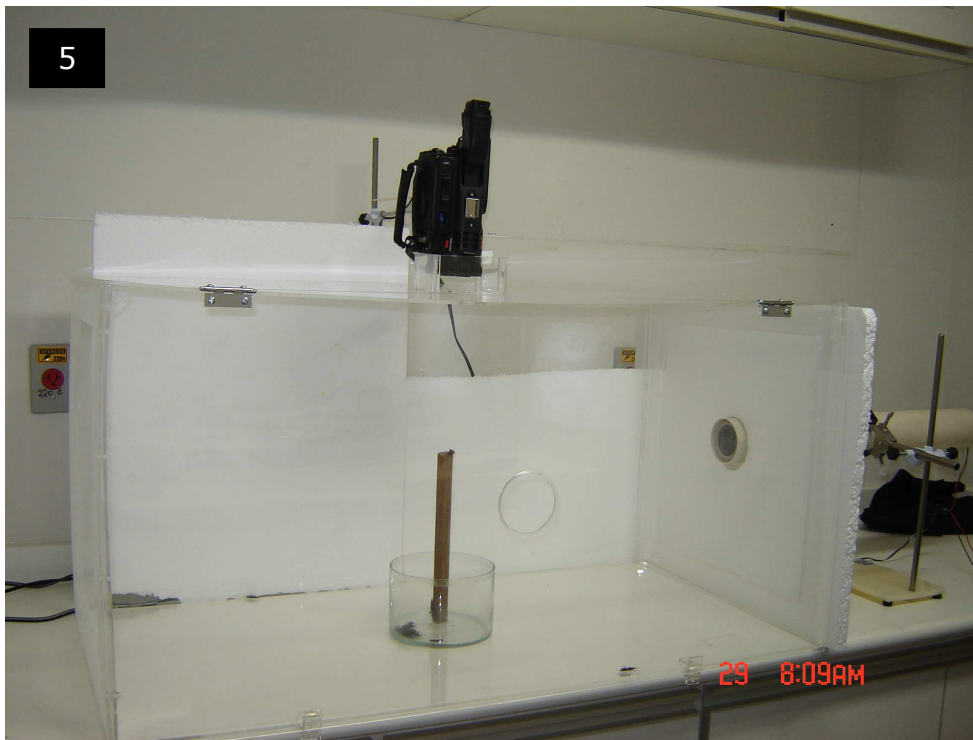


**Figura 4.** A) Desenho esquemático da gaiola de voo. B) Arena experimental utilizada no interior da gaiola.



**B**





**Figura 5 e 6.** Gaiola de voo utilizada para analisar o início da atividade de voo em adultos de *Triatoma brasiliensis*.

### 4.2.3 Análise estatística

Diferenças na frequência de início da atividade de voo entre as diferentes séries foram analisadas através de testes estatísticos para dados paramétricos. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas através de uma ANOVA de 2 fatores [(1) sexo e (2) tipo de estímulo] após verificar a normalidade dos dados através do teste Shapiro-Wilk (STATISTICA, Statsoft Inc. 1996). Cada fator foi tratado separadamente e analisados os efeitos simples. A frequência de início de voo e a sua direção foram utilizadas como indicadores de ativação e orientação, respectivamente. Em cada ensaio foi registrado, (a) o número total de insetos que iniciaram o voo (ativação) e (b) a direção escolhida por cada inseto (orientação). Para a registro do comportamento e posterior análise, a vista superior da plataforma de voo foi projetada em um monitor de TV e a imagem dividida em oito setores iguais de 45° cada um. A orientação escolhida durante a decolagem dos insetos foi analisada através da estatística circular (Batschelet 1965, Fischer 1993). Este tipo de análise permite avaliar componentes tais como a direção média escolhida pelos insetos (ângulo médio ou  $\mu$ ) e a intensidade com que os indivíduos mantiveram uma determinada direção (usando o comprimento do vetor resultante ou  $r$ ). Os valores de  $\mu$  (ângulo médio) podem variar entre 0° e 360° e os valores de  $r$  (vetor) entre 0 e 1 (0 indica uma direção indefinida ou acaso, enquanto 1 indica uma direção claramente determinada). A direção da corrente de ar foi convencionalmente definida como o ângulo 0°, enquanto o lado oposto correspondeu a 180° (Figura 4B).

Para a análise estatística dos dados de direção de início de voo utilizou-se o teste Rayleigh, propondo uma hipótese nula  $H_0$ , na qual a população de dados estará uniformemente distribuída em torno do círculo, ou seja, não há uma direção definida; e uma hipótese alternativa  $H_a$ , na qual a população de dados não segue uma distribuição uniformemente distribuída. No caso em que os dados se afastavam significativamente de uma distribuição uniforme, aplicou-se o teste-V (Greenwood & Durand 1955, Durand & Greenwood 1958) para avaliar se o ângulo médio

calculado ( $\mu$ ) era significativamente diferente do ângulo médio esperado (ou seja, da direção da corrente de ar que transportava os estímulos).

### **4.3 Comunicação química entre sexos em *Triatoma brasiliensis* – O papel das glândulas exócrinas**

#### 4.3.1 Insetos

Os insetos utilizados foram criados em frascos cilíndricos de acrílico forrados com papel de filtro. Cada frasco possuía uma base de 15 cm de diâmetro e altura de 20 cm. No interior dos mesmos, uma tira de cartolina dobrada em forma de sanfona foi oferecida aos insetos para aumentar a superfície interna. Os recipientes foram fechados com tecido de algodão permitindo que os insetos se alimentassem através do mesmo. Os insetos foram separados por sexo antes da muda imaginal, de acordo com a técnica de Espínola (1966). Para permitir a correta sincronização das atividades controladas por processos circadianos, os triatomíneos foram mantidos em fotoperíodo 12:12 L/E. Os insetos foram alimentados semanalmente em camundongos suíços (*Mus musculus*) obtidos do Biotério Central do Centro de Pesquisas René Rachou e mantidos em uma temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa de  $64 \pm 10$  %. Para amostragem da secreção das glândulas foram utilizados adultos com um mês de idade após a ecdise e jejum de 15 dias.

#### 4.3.2 Olfatometria

##### a) Aparato

Foi utilizado um olfatômetro para testar a resposta de adultos de *T. brasiliensis* confrontados com odores liberados por coespecíficos. Os experimentos foram conduzidos usando um olfatômetro de acrílico em forma de "T". O olfatômetro apresentava dois braços de 21,5 cm cada, e um braço comum de 33,5 cm de comprimento. A seção de todos os braços foi de 24 cm<sup>2</sup> (Figura 7, ver arranjo geral). O dispositivo foi posicionado horizontalmente sobre uma mesa e no seu interior, papéis de filtro foram utilizados para cobrir o substrato. A corrente de ar que fluía no olfatômetro durante os ensaios foi produzida por sucção no extremo de

liberação dos insetos. A velocidade da corrente de ar foi mantida a 10 cm/s e o fluxo foi gerado por um ventilador axial controlado por uma resistência variável (reostato). Para mensurar a velocidade do ar foi utilizado um anemômetro (Testo Alemanha). Na extremidade de cada braço, uma câmara liberadora de odor foi conectada ao olfatômetro através de uma mangueira de silicone. A entrada de ar de cada uma destas câmaras foi conectada a um filtro de carvão ativado para eliminar quaisquer odores presentes no ar da sala. Os filtros foram descontaminados a cada 15 dias mediante exposição a calor em estufas mantidas a 50 °C.

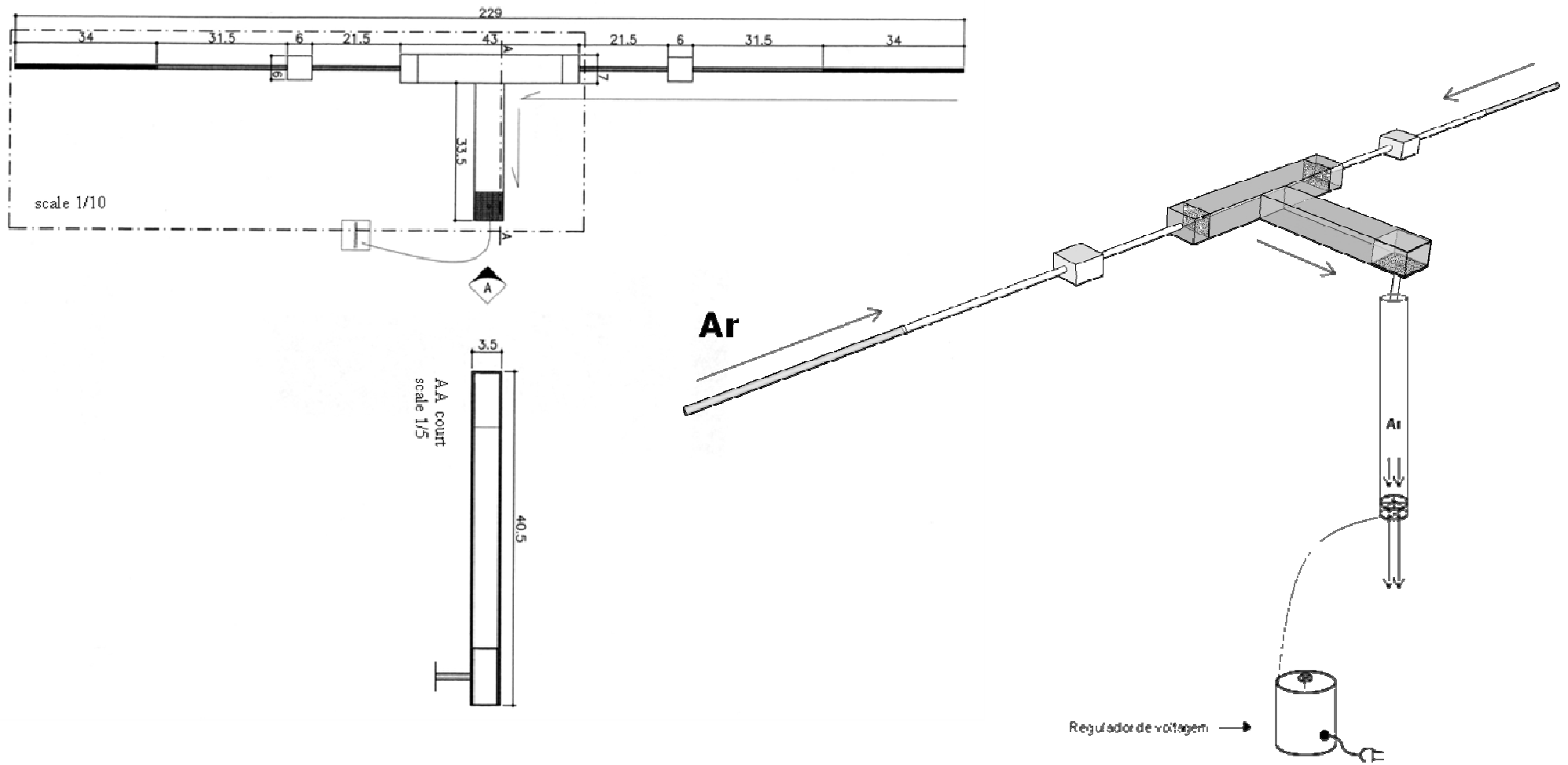
Para evitar uma possível contaminação do olfatômetro pelos insetos testados, o papel de filtro que cobria o substrato foi trocado a cada teste. Após cada ensaio, as fontes de estímulos também foram substituídas por outras novas e a sua associação com cada um dos braços do olfatômetro (direita ou esquerda) foi invertida.

#### b) Calibragem do aparato

Testes preliminares foram realizados para avaliar a frequência de escolha dos insetos pelos dois braços do olfatômetro. Os tratamentos avaliados foram: sem corrente de ar vs. sem corrente de ar (SA x SA), corrente de ar limpo vs. corrente de ar limpo (AL x AL). Como nos testes preliminares sem corrente de ar e com corrente de ar limpo não houve diferenças significativas na proporção de escolha pelos diferentes braços (Tabela 1), considerou-se que o aparato apresentava características simétricas para os insetos.

**Tabela 1.** Escolha dos adultos de *T. brasiliensis* nas séries de calibragem do olfatômetro (SA=sem corrente de ar, AL=corrente de ar limpo). Diferenças significativas entre o estímulo teste e o controle foram avaliadas utilizando o teste Binomial. \* $P \leq 0,05$  e n.s  $P \geq 0,05$ .

<b>Estímulo (inseto teste)</b>	<b>N</b>	<b>Escolha</b>	<b>teste Binomial</b>
SA x SA (♀)	30	14,0 X 16,0	n.s
SA x SA (♂)	30	15,0 X 15,0	n.s
AL x AL (♀)	30	15,0 X 15,0	n.s
AL x AL (♂)	30	15,0 X 15,0	n.s



**Figura 7.** Desenho esquemático do olfatômetro em "T" mostrando as medidas em cm (por Arnaldo Aroeira)

### 4.3.3 Ensaios de escolha simultânea

A orientação de adultos de cada um dos sexos confrontados com correntes de ar associadas com odores liberados por machos ou fêmeas foi testada. Na extremidade de um dos braços, apresentou-se o estímulo a ser testado, enquanto na extremidade do outro braço foi apresentado apenas um papel de filtro limpo como estímulo controle. Foram utilizados como estímulo dois machos ou duas fêmeas virgens. O registro de uma escolha foi feito utilizando o seguinte critério: havia escolha toda vez que um inseto atravessava o limite que separava o tronco principal de um dos braços com o corpo inteiro. Apenas a primeira escolha foi registrada para cada inseto e o tempo máximo de observação em cada teste foi de 15 minutos. Os insetos que não mostraram uma resposta depois de transcorrido este período foram descartados.

Foram realizadas dez séries experimentais, cada uma com 30 repetições, a saber:

**Exp.1:** fêmeas confrontadas com correntes de ar associadas com odor de fêmea.

**Exp.2:** fêmeas confrontadas com correntes de ar associadas com odor de macho.

**Exp.3:** fêmeas confrontadas com correntes de ar associadas com odor de camundongo.

**Exp.4:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de macho.

**Exp.5:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmea.

**Exp.6:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio.

**Exp.7:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmea cujas glândulas metasternais foram ocluídas.

**Exp.8:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmea submetidas ao tratamento com parafina, porém sem ocluir as glândulas metasternais (controle).



**Exp.9:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de macho cujas glândulas metasternais foram ocluídas.

**Exp.10:** machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de macho submetidos ao tratamento com parafina, porém sem ocluir as glândulas metasternais (controle).

Os tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram realizados para verificar a existência de sinais químicos provenientes de coespecíficos que pudessem promover respostas em machos e/ou fêmeas. Os testes com odor de camundongo como estímulo foram realizados somente para fêmeas como controle positivo que permitiu demonstrar a capacidade do dispositivo para detectar orientação nestes insetos. A cada repetição, o camundongo (*Mus musculus*) presente na câmara liberadora de estímulo foi trocado por outro indivíduo. Após verificarmos uma resposta anemotática positiva dos machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de macho e de fêmea, os tratamentos 7 a 10 foram conduzidos para tentar identificar as fontes dos estímulos químicos que promoviam essas respostas.

#### a) Análise estatística

Nos testes de olfatometria, a análise estatística das escolhas entre cada braço do olfatômetro foi realizada através do teste Binomial.

#### 4.3.4 Influência dos odores das glândulas metasternais e de Brindley na frequência de cópula

Para verificar a influência dos odores emitidos pelas glândulas metasternais e de Brindley na frequência de cópula, os orifícios de saída destas glândulas foram ocluídos mediante a aplicação de parafina derretida. Os diferentes grupos de insetos adultos utilizados neste experimento foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1- Casais intactos para definição da frequência basal de cópula;
- 2- Fêmeas com parafina aplicada no metatórax dorsal, sem ocluir as glândulas (CF);
- 3- Fêmeas com os orifícios das glândulas metasternais ocluídos (GMFO);

- 4- Fêmeas com os orifícios das glândulas de Brindley ocluídos (GBFO);
- 5- Machos com parafina aplicada no metatórax dorsal, sem ocluir as glândulas (CM);
- 6- Machos com os orifícios das glândulas metasternais ocluídos (GMMO);
- 7- Machos com os orifícios das glândulas de Brindley ocluídos (GBMO).

a) Técnica de oclusão das glândulas.

Para cada tratamento foram realizadas 20 repetições. A oclusão das glândulas metasternais e de Brindley foi feita utilizando-se parafina (Sigma-Aldrich) aquecida a 41,5°C por meio de um micro-cauterizador Max Wax (Electron Microscopy Sciences, USA). O procedimento de oclusão das glândulas foi realizado com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os adultos foram mantidos em frascos separados individualmente por 48 horas, até a realização do experimento. Em cada experimento, um casal foi colocado dentro de uma placa de Petri (10cm de diâmetro e 15cm de altura) com o substrato coberto com papel de filtro. A transferência dos casais para as placas foi cuidadosamente realizada com o auxílio de um pedaço de papel para evitar a perturbação dos insetos. Cada ensaio teve uma duração de 30 minutos e a ocorrência da cópula foi registrada através de observação direta. O tempo de observação foi definido a partir de estudos prévios do comportamento de cópula de *T. brasiliensis*.

b) Análise estatística

A frequência de cópula registrada em cada tratamento foi analisada através do teste Qui-quadrado ( $X^2$ ), seguido de comparações múltiplas usando a correção de Bonferroni. Portanto, as diferenças foram consideradas significativas quando as comparações apresentaram  $p < 0,003$ .

$$\text{O Método de Bonferroni: } \frac{\alpha}{n^{\circ} \text{ comparações}} = \frac{0,05}{21} = 0,003 .$$

#### **4.4 Respostas eletrofisiológicas da antena de machos de *Triatoma brasiliensis* aos odores da glândula metasternal de fêmeas**

##### 4.4.1 Insetos

Os insetos foram separados por sexo antes da muda imaginal e mantidos em fotoperíodo 12:12 L/E a  $27 \pm 1$  °C e  $64 \pm 10$  % de umidade relativa. Os triatomíneos adultos foram alimentados semanalmente em sangue de camundongo suíço ou de galinhas, alternadamente. Para os experimentos foram utilizados adultos virgens com 30 dias de idade e 12 dias de jejum.

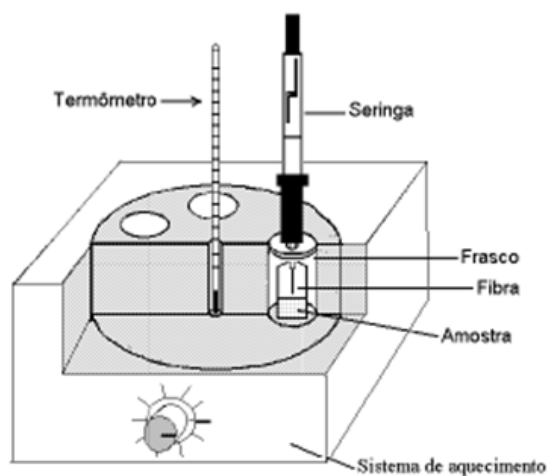
##### 4.4.2 Identificação das secreções das glândulas metasternais

Os insetos foram mantidos em freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 min, antes da sua dissecação, para evitar respostas de perturbação e a consequente perda dos compostos liberados pelas glândulas devido à manipulação. Em seguida foram fixados em massa de modelar em posição ventral, retirando as glândulas metasternais, localizadas no metatórax lateral e situadas contíguas à cavidade de inserção do terceiro par de patas. Esta preparação foi realizada em uma placa de Petri preenchida com gelo, na qual foi colocada uma segunda placa de Petri menor, que continha o inseto. Deste modo, a dissecação ocorreu em baixa temperatura ( $0^{\circ}\text{C}$ ) para minimizar a volatilização das substâncias presentes nas glândulas.

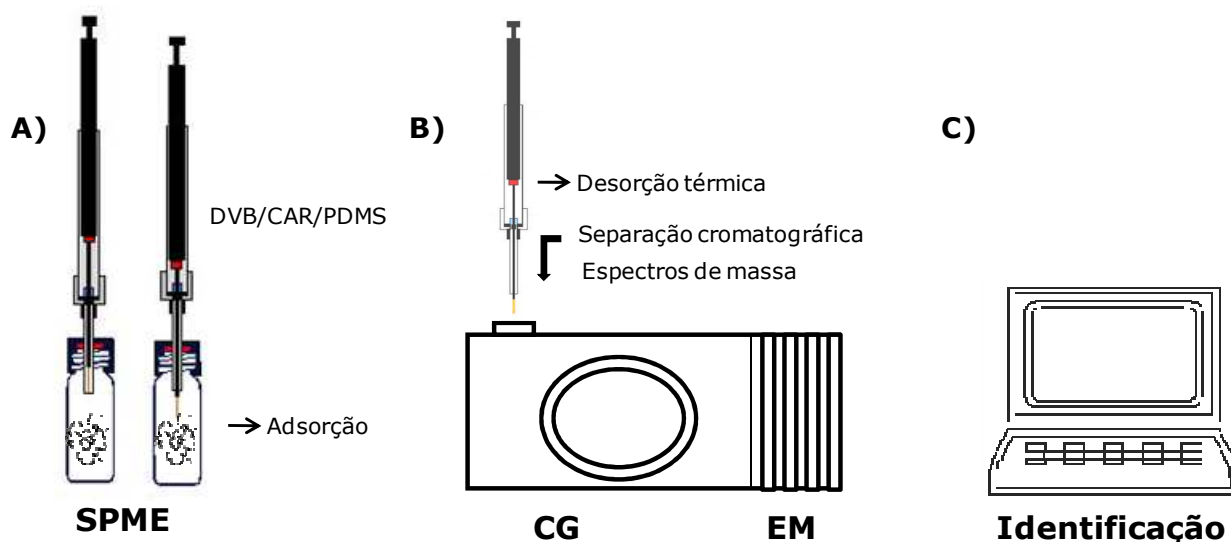
As secreções das glândulas metasternais foram obtidas de adultos de *T. brasiliensis* com 30 dias de idade e 15 dias de jejum. O nível de jejum mencionado permite evitar a contaminação das amostras por fezes durante a dissecação. Uma vez dissecadas, as glândulas foram armazenadas em frascos de vidro de 2ml, fechados com tampas com septos de teflon<sup>R</sup>/silicone. A análise das amostras foi realizada separadamente para cada sexo e cada uma delas era composta por dez glândulas. Foram realizadas análises em 5 amostras de machos e 5 amostras de fêmeas. Amostras controle, contendo pedaços de cutícula e tecidos internos de outras partes do corpo dos insetos também foram

analisadas. As dissecações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 0,1M.

Cada amostra foi sonicada em aparelho de ultra-som utilizando uma frequência de 40 kHz durante 5 min (Thorton, Inpec Eletrônica, Brazil). Subsequentemente, a amostra foi aquecida a 50 °C durante 10 min. Após este procedimento, uma fibra de microextração em fase sólida (SPME) do tipo DVB/CAR/PDMS de 50-30 µm de espessura e 2 cm de comprimento (SUPELCO, USA) foi utilizada para adsorção dos odores presentes na fase gasosa dentro do frasco com a amostra. A fibra foi inserida através do septo e exposta aos voláteis presentes no frasco durante 30 min a 50 °C (Figura 8). Em todos os casos, os voláteis adsorvidos foram posteriormente vaporizados no porto de injeção do CG por exposição da fibra imediatamente após a amostragem (Figura 9).



**Figura 8.** Desenho esquemático do sistema de aquecimento das amostras de glândulas de adultos de *T. brasiliensis*.



**Figura 9.** Desenho esquemático da metodologia de extração por SPME, desorção térmica e identificação das substâncias em CG-EM.

#### 4.4.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Os voláteis adsorvidos através da técnica de SPME foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG Shimadzu 17A, EM Shimadzu 5050A). As fibras carregadas com odores foram expostas no injetor no modo *splitless* a 230°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma velocidade de 30 cm/s. A coluna usada foi do tipo SupelcoWax-10 com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno (SUPELCO, USA). A temperatura de interface do detector de massa foi de 250°C, a energia de ionização 70 eV e o espectrômetro de massa programado para varrer uma faixa de 40 a 300M/Z.

Para a separação dos voláteis foi utilizado o seguinte programa de temperatura: 5 min a 40 °C, e posteriormente uma taxa de 3 °C/min até 120 °C e uma segunda fase com uma taxa de 15 °C/min até 230 °C. A identificação preliminar dos voláteis foi baseada na análise do seu espectro de massa e sua comparação com os dados da biblioteca espectral do CG-EM (NIST-02). A confirmação da identidade dos compostos foi feita através de co-injeção de padrões sintéticos e posterior confirmação do aumento dos picos em questão. Nos casos em que a molécula identificada apresentava características quirais, foram utilizadas colunas quirais para

determinar quais enantiômeros estavam presentes na amostra natural. Todos estes trabalhos foram realizados em colaboração com o estudante de doutorado Björn Bohman e o Prof. Rikard Unelius, pesquisadores do Departamento de Ciências Naturais Puras e Aplicadas da Universidade de Kalmar, na Suécia.

#### 4.4.4 Compostos químicos

Foram obtidos da Sigma-Aldrich (Suécia e Brasil) os seguintes padrões sintéticos: 2-butanona, 3-pentanona, (2*S*)-butanol, 2-metil-1-propanol, 3-pentanol, (2*R*)-pentanol, (3*R/S*)-hexanol, (2*S*)-metil-1-butanol, 1-heptanol e 1-feniletanol. Devido a não disponibilidade de algumas amostras comerciais, a síntese de alguns compostos foi realizada pelos colaboradores mencionados. Os seguintes compostos quirais e aquirais foram sintetizados: (4*R*)-metil-1-hexanol, 3-metil-2-hexanol, 6-metil-1-heptanol, (4*R*)-metil-1-heptanol, 4-etil-2-isopropil-5-metil-1,3-dioxolano I, 4-etil-2-isopropil-5-metil-1,3-dioxolano II, e 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano.

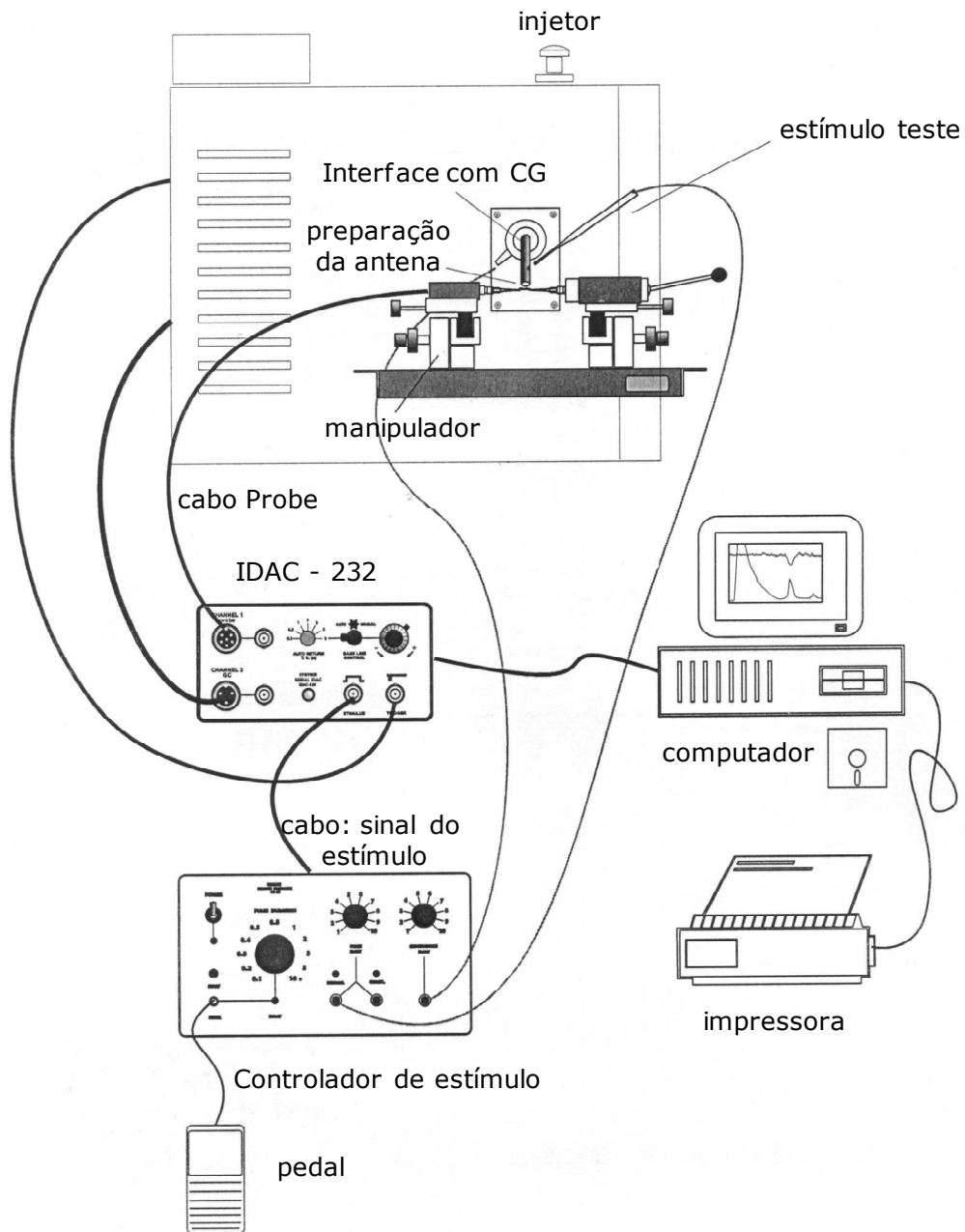
#### 4.4.5 Eletroantenodeteccção acoplada a cromatografia gasosa (CG-EAD)

Os eletrodos utilizados para os registros eletroantegráficos foram constituídos por capilares de vidro preenchidos com solução KCL de concentração 0,1 M e associados a arames de prata de 20-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no seu interior. A antena de cada inseto foi seccionada na base do escapo e posteriormente inserida no interior de um eletrodo de referência. Em seguida, a ponta do flagelo foi seccionada para facilitar a condução dos impulsos elétricos e o eletrodo montado em um micromanipulador (MP-12, Syntech, Holanda). Subsequentemente, o extremo distal da antena foi inserido no interior do eletrodo de registro. Desta forma, registrou-se a diferença de potencial entre ambos os extremos da antena. O sinal captado pelo eletrodo de registro foi inicialmente processado por um pré-amplificador de resistência de entrada de  $10^{12}$  Ohms (CS-05, Syntech Holanda). O sinal foi posteriormente digitalizado utilizando uma placa de conversão analógico-digital (Figura

10, IDAC 232, Syntech, Holanda). O armazenamento e posterior análise das respostas foram realizados mediante um computador equipado com um software específico para CG-EAD (GC-EAD2000, Syntech, Holanda).

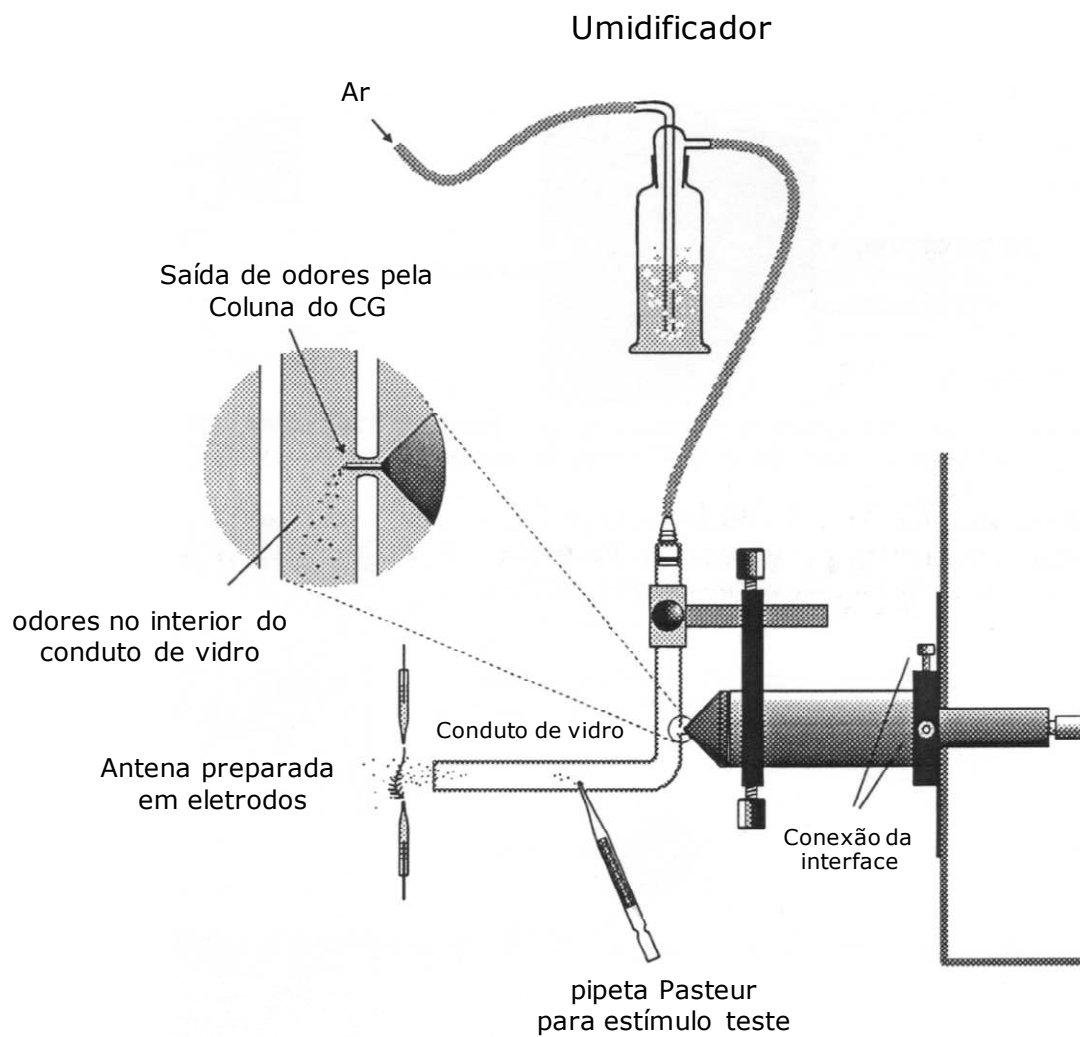
Os estímulos foram apresentados às antenas através de uma corrente de ar de fluxo controlado (280 ml/min) e umidificada após passar por um recipiente com água destilada. A corrente de ar foi conduzida por meio de uma mangueira de silicone até um tubo de vidro em forma de "L" (11cm x 8cm), cuja extremidade distal era posicionada a 1cm da antena (Figura 11). A antena foi sustentada pelos dois capilares de vidro e centralizada em relação ao orifício de saída da corrente de estimulação (diâmetro da boca do tubo: 0,5 cm). Deste modo, a corrente alcançava a totalidade da antena. Para testar a viabilidade das preparações antes de iniciar os ensaios, um pulso de um odor de atividade conhecida foi apresentado por meio de uma Pipeta Pasteur inserida em um orifício presente no tubo principal de vidro. Para os registros foram utilizadas 7 antenas de machos diferentes.

Os voláteis adsorvidos por SPME foram analisados por cromatografia gasosa (CG Shimadzu 17A). Além disso, utilizou-se o mesmo programa de temperatura descrito no item 4 para a separação dos voláteis. Foram analisadas 7 amostras de glândulas metasternais de fêmea, cada uma contendo 10 glândulas.



**Figura 10.** Desenho esquemático do sistema de CG-EAD (Syntech, 2001).





**Figura 11.** Detalhe ampliado da interface do sistema de CG-EAD (Syntech, 2001).

## **4.5 Comportamento de cópula e associação pós-acasalamento em *Triatoma brasiliensis***

### 4.5.1 Insetos

Os insetos foram separados por sexo antes da muda imaginal de acordo com a técnica de Espínola (1966) e Lent & Juberg (1969). A colônia foi mantida em fotoperíodo 12:12 L/E a  $26 \pm 1$  °C e  $64 \pm 10$  % de umidade relativa. Para os experimentos foram utilizados insetos com 30 dias de idade e com uma semana de jejum, exceto no experimento de maturação sexual no qual os detalhes de idade e alimentação foram descritos abaixo. Os insetos foram alimentados semanalmente em camundongos suíços (*Mus musculus*) e galinhas (*Gallus gallus*) de maneira alternada.

### 4.5.2 Comportamento sexual

Para descrever o comportamento sexual de *T. brasiliensis*, o comportamento de 10 casais virgens foi avaliado. Em cada ensaio, uma fêmea e um macho foram introduzidos cuidadosamente no centro de uma arena experimental de vidro de 15cm de altura e 10cm de diâmetro usando pequenos recipientes. O substrato da arena experimental foi coberto com papel de filtro para facilitar o deslocamento dos insetos. O registro de dados para análise do comportamento sexual foi realizado através da observação direta.

De acordo com Brasileiro (1984), a cópula de *T. brasiliensis* tem duração média de aproximadamente 7 minutos. Experimentos preliminares confirmaram os dados de Brasileiro (1984) e indicaram que a cópula normalmente começa durante os primeiros 7 minutos após a introdução dos insetos na arena. Por esta razão, se nenhum acasalamento ocorria durante os primeiros 30 minutos, o casal era retirado da arena e substituído por outro. Para descrever os tipos de eventos comportamentais observados durante o acasalamento desta espécie foram registrados: a) o número e tipo de tentativas de cópula exibidas pelos machos, b) o número e o tipo de rejeições exibidas pelas fêmeas.

### 4.5.3 Maturação sexual

A maturação do comportamento sexual em *T. brasiliensis* logo após a muda imaginal foi estudada experimentalmente. Foram utilizados machos e fêmeas com idade e estado nutricional conhecidos. Para cada série experimental foram utilizados 10 casais virgens. Considerando que para outras espécies de triatomíneos a idade parece ser o principal fator para a maturação sexual (Regis et al. 1985, Malo et al. 1993), os adultos deste experimento foram alimentados somente no 27º dia após a muda para verificar se a idade afetava a maturação sexual de *T. brasiliensis*. Além disso, uma alimentação foi oferecida neste dia para testar se o repasto induz uma mudança no comportamento sexual destes insetos.

Para analisar o comportamento de cada casal foi utilizada uma arena experimental de vidro de 15cm de altura e 10cm de diâmetro, com papel de filtro como substrato. Os experimentos foram realizados numa sala com iluminação controlada (18-19 lux). Diariamente, cada casal foi liberado na arena e a sua motivação para acasalar avaliada através de observação direta. Os ensaios foram desenvolvidos exclusivamente durante as primeiras quatro horas da fase escura. O comportamento de acasalamento de cada casal foi observado diariamente por 30 min durante um período de 34 dias a partir da ecdise. As tentativas de cópula aceitas pelas fêmeas foram interrompidas no instante prévio à inserção do edeago na genitália da fêmea para garantir que os insetos permanecessem virgens durante todo o experimento.

Para quantificar o efeito da idade e do estado alimentar na maturação sexual destes insetos, três parâmetros do comportamento sexual foram registrados antes e após a alimentação: a) número de tentativas de cópula realizadas pelos machos, b) número de rejeições exibidas pelas fêmeas e c) o número de cópulas (números de fêmeas que aceitaram a cópula).

Para determinar o período de maturação do comportamento sexual em cada sexo, cinco séries experimentais foram realizadas. Nas diferentes séries, variou-se o estado nutricional e a idade dos insetos de cada sexo para verificar separadamente os seus efeitos sobre os parâmetros

comportamentais analisados. Os resultados foram registrados em insetos submetidos aos seguintes tratamentos: 1) machos e fêmeas em jejum (T1), 2) machos e fêmeas alimentados (T2), 3) machos em jejum e fêmeas alimentadas (T3), 4) machos alimentados e fêmeas em jejum (T4), e 5) machos jovens em jejum e fêmeas alimentadas (T5).

#### 4.5.4 Poliandria e associação pós-acasalamento (APA)

Um experimento foi realizado para testar se as fêmeas de *T. brasiliensis* são capazes de copular com mais de um macho em um intervalo de tempo de 90 minutos. Foram utilizados grupos (20) compostos por uma fêmea e três machos, todos virgens. Para registrar os dados, um macho foi introduzido na arena e mantido por 30 minutos com a fêmea. No final deste período, o primeiro macho foi retirado e um segundo foi imediatamente introduzido na arena e da mesma forma com o terceiro macho. Os insetos foram introduzidos ou retirados da arena utilizando uma peça de papel de filtro para prevenir reações de perturbação.

Para testar o efeito da presença de outros machos na duração da cópula e das associações pós-cópula, três tratamentos foram desenvolvidos. O primeiro tratamento formado por 1 macho e 1 fêmea (1M:1F), o segundo formado por 3 machos e 1 fêmea (3M:1F) e o terceiro formado também por 3 machos e 1 fêmea, porém, neste último, cada macho que copulava era retirado da arena, restando assim apenas um macho no final de cada experimento (3M:1F-). Cada tratamento foi repetido 10 vezes. Em todos os casos, fêmea e macho(s) foram liberados simultaneamente na arena. A associação pós-acasalamento (APA) foi definida como o tempo gasto entre a separação das genitálias e o afastamento corporal do macho.

#### 4.5.5 Análise estatística

Os tratamentos foram comparados por meio do teste t de Student ou por meio da análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a ANOVA foi utilizada, comparações *pos hoc* foram feitas usando o teste Tukey.

Foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (quando foram analisados mais de 2 fatores) e Mann-Whitney (quando comparou-se 2 fatores) para as variáveis que não apresentaram uma distribuição normal. O nível de significância aceito foi  $p > 0.05$  (95%).

## RESULTADOS

---

## 5 Resultados

### 5.1 Uso de abrigos por adultos de *Triatoma brasiliensis*

#### 5.1.1 A atividade basal em abrigos

A atividade média basal de saída dos abrigos de fêmeas foi significativamente maior do que a apresentada por machos (teste t de Student para amostras independentes,  $P < 0,002$ ). Consistentemente, as fêmeas mostraram um nível de atividade locomotora basal significativamente maior que a dos machos (teste t de Student para amostras independentes,  $P < 0,0001$ ).

#### 5.1.2 Efeito da presença de odor de insetos do sexo oposto

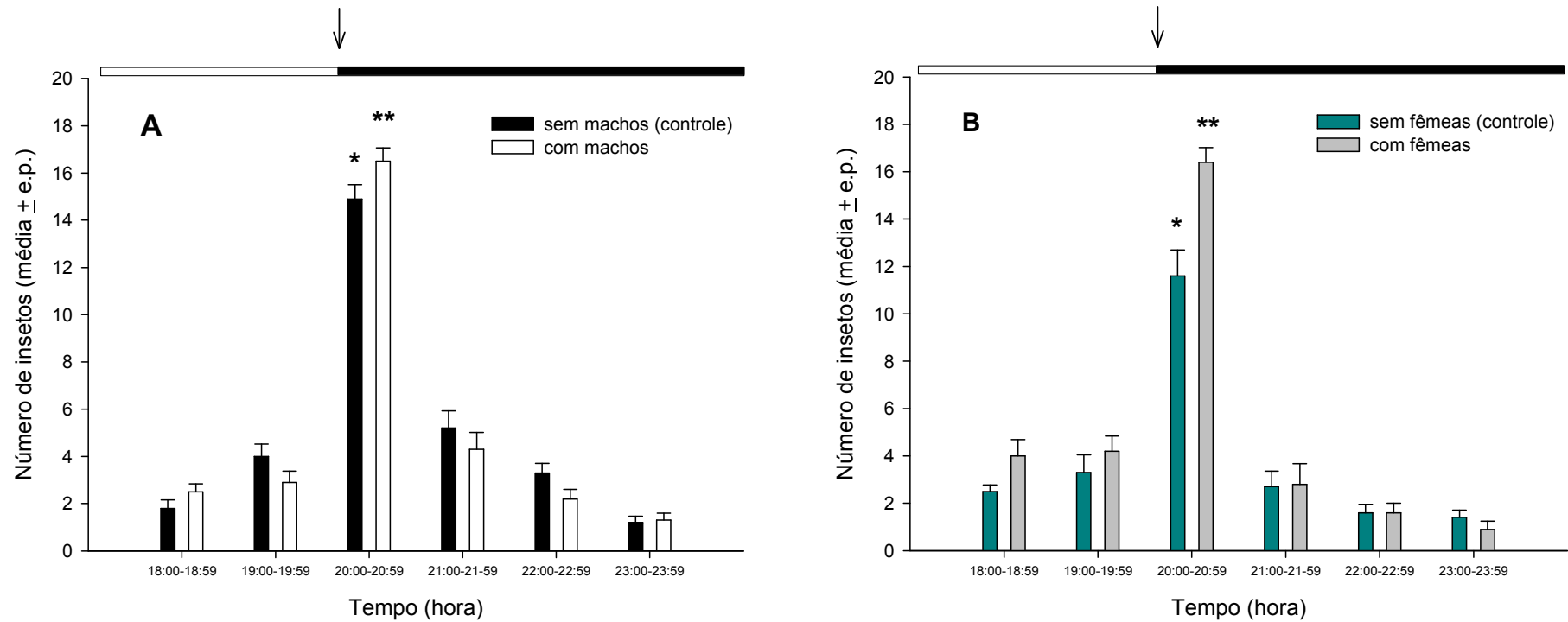
A presença de odores de machos não afetou a atividade média de saída dos abrigos das fêmeas desta espécie (teste t de Student para amostras pareadas, n.s.). De maneira semelhante, o nível de atividade locomotora das fêmeas, uma vez fora dos abrigos, não foi afetado pela presença de odores de machos (teste t de Student para amostras pareadas, n.s.). Por outro lado, machos desta espécie mostraram um aumento significativo no número médio de saídas dos abrigos na presença de odor de fêmea (teste t de Student para amostras pareadas,  $P < 0,001$ ). De forma consistente, o nível de atividade dos machos também aumentou significativamente na presença deste estímulo (teste t de Student para amostras pareadas,  $P < 0,001$ ). O último parâmetro analisado, i.e., o número médio de tentativas de cópula entre machos, apresentou um aumento significativo na presença de odor de fêmea (teste t de Student para amostras pareadas,  $P < 0,003$ ).

#### 5.1.3 Padrão temporal de saídas, de atividade locomotora e de tentativas de cópula entre machos.

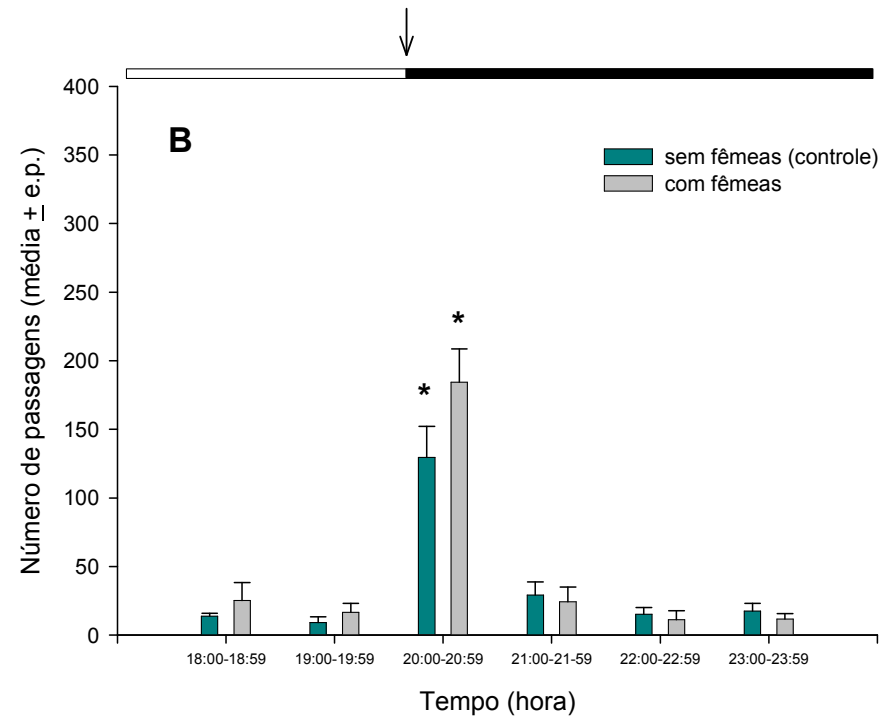
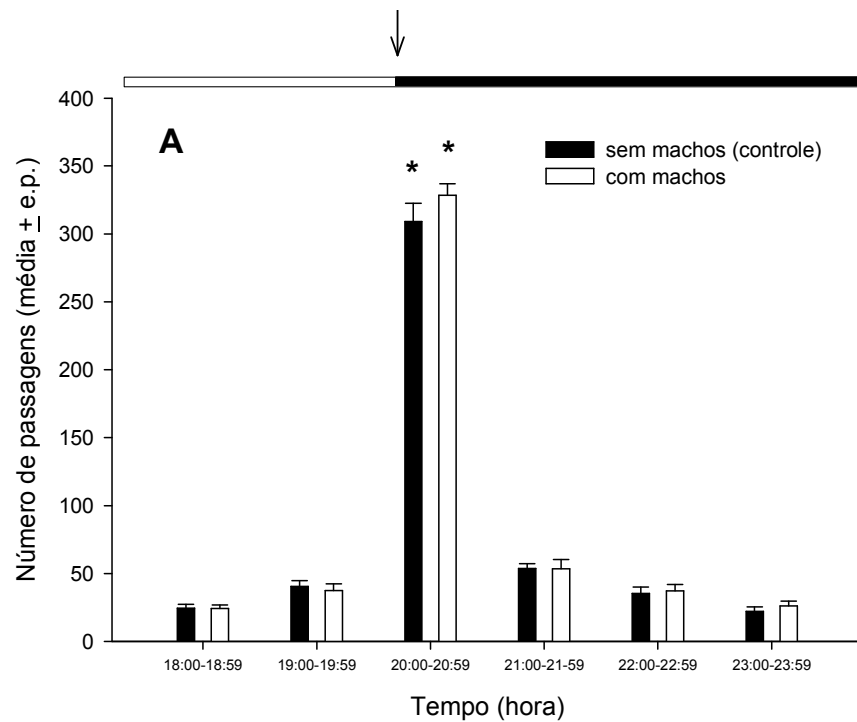
O padrão temporal de saídas do abrigo em adultos de ambos os sexos variou significativamente ao longo do período estudado (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,001$ , Figura 12). Observou-se um aumento significativo do número de saídas do abrigo em machos e fêmeas durante a primeira hora da escotofase (teste de Tukey,  $P < 0,0001$ , Figura 12).

Além disso, a atividade locomotora dos adultos variou significativamente ao longo do período estudado (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,001$ , Figura 13). De fato, a atividade locomotora dos machos e das fêmeas foi significativamente mais intensa durante a primeira hora da fase escura (teste de Tukey,  $P < 0,0001$ , Figura 13). De maneira consistente, o número médio de tentativas de cópula realizado pelos machos variou significativamente ao longo do tempo experimental (ANOVA,  $P < 0,001$ , Figura 14). Os machos de *T. brasiliensis* apresentaram um número significativamente maior de tentativas de cópula durante a primeira hora da escotofase (teste de Tukey,  $P < 0,0001$ ). Finalmente, as tentativas de cópula aumentaram significativamente na presença de odor de fêmea (ANOVA,  $P < 0,002$ , Figura 14), e este efeito pareceu ser restrito à primeira hora da fase escura.

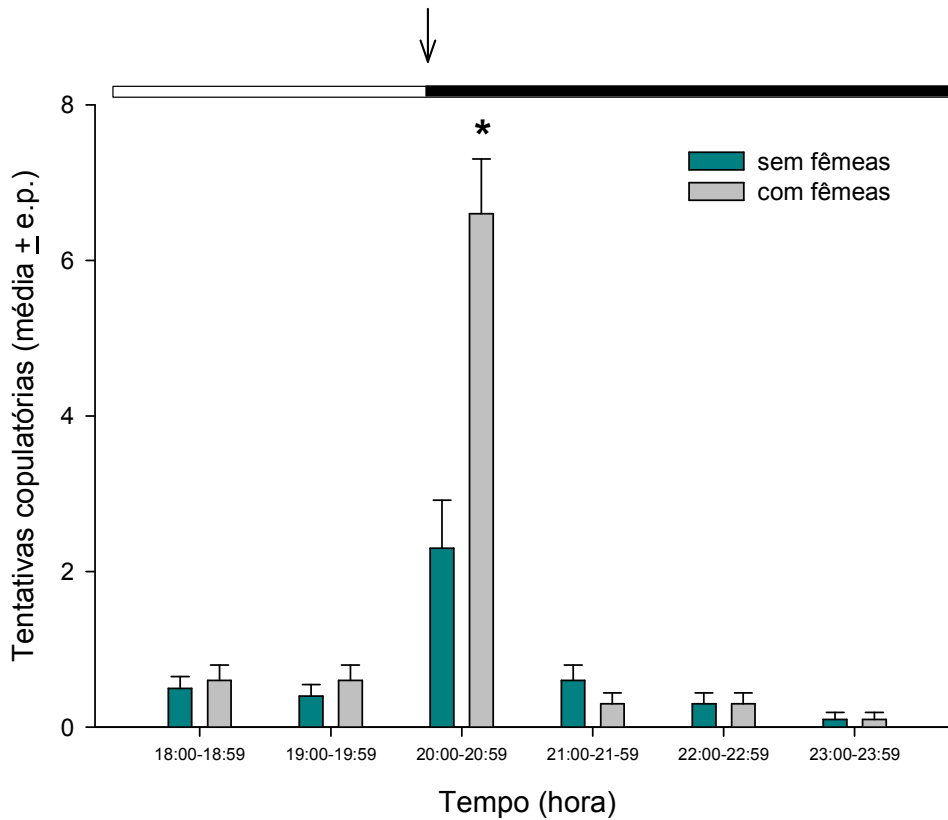




**Figura 12.** Padrão temporal de saídas do abrigo em adultos de *T. brasiliensis*. Número médio de fêmeas (A) e machos (B) que saíram do abrigo por hora na ausência e na presença de odores do sexo oposto. A barra acima do gráfico representa o ciclo de iluminação artificial, branco: fase de luz; preto: fase escura. Teste ANOVA de medidas repetidas ( $p < 0,001$ ) e análise *post hoc* mediante o teste de Tukey (\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,001$ ).



**Figura 13.** Padrão temporal de atividade locomotora em torno do abrigo em adultos de *T. brasiliensis*. Número médio de passagens em fêmeas (A) e machos (B) na ausência e presença de odores do sexo oposto. A barra acima do gráfico representa o ciclo de iluminação artificial: branco: fase de luz; preto: fase escura. Diferenças significativas na atividade locomotora ao longo do tempo foram definidas por meio de uma ANOVA de medidas repetidas de dois fatores (limite discriminante,  $P < 0,05$ ) e análise *post hoc* mediante o teste de Tukey (\* $p < 0,001$ )



**Figura 14.** Padrão temporal de tentativas de cópula realizadas pelos machos. Os dados graficados representam o número médio de tentativas de cópula por hora realizada por machos na ausência e na presença de odores de fêmea. Diferenças significativas no número médio de tentativas de cópula ao longo do tempo foram definidas por meio de uma ANOVA de medidas repetidas de um fator (limite discriminante,  $P < 0,05$ ) e análise *post hoc* mediante o teste de Tukey (\*  $p < 0,0001$ ).

## **5.2 Início da atividade de voo em machos de *Triatoma brasiliensis* mediado por odor de fêmea**

A atividade basal de início de voo em fêmeas e machos foi semelhante quando os insetos foram confrontados com correntes de ar limpo (ANOVA, n.s., Figura 15). Quando confrontados com correntes de ar limpo, apenas 30 % dos machos presentes nos ensaios iniciaram o voo (Figura 15). De maneira semelhante, quando os machos foram confrontados com correntes de ar associadas a odor de outros machos, não houve uma mudança significativa neste parâmetro, já que apenas 37 % dos machos iniciaram o voo (ANOVA, n.s., Figura 15). Entretanto, quando odor de fêmea foi associado à corrente de ar, houve uma mudança significativa, visto que, uma média de 42 % dos machos iniciou o voo (ANOVA,  $P < 0,04$ , Figura 15).

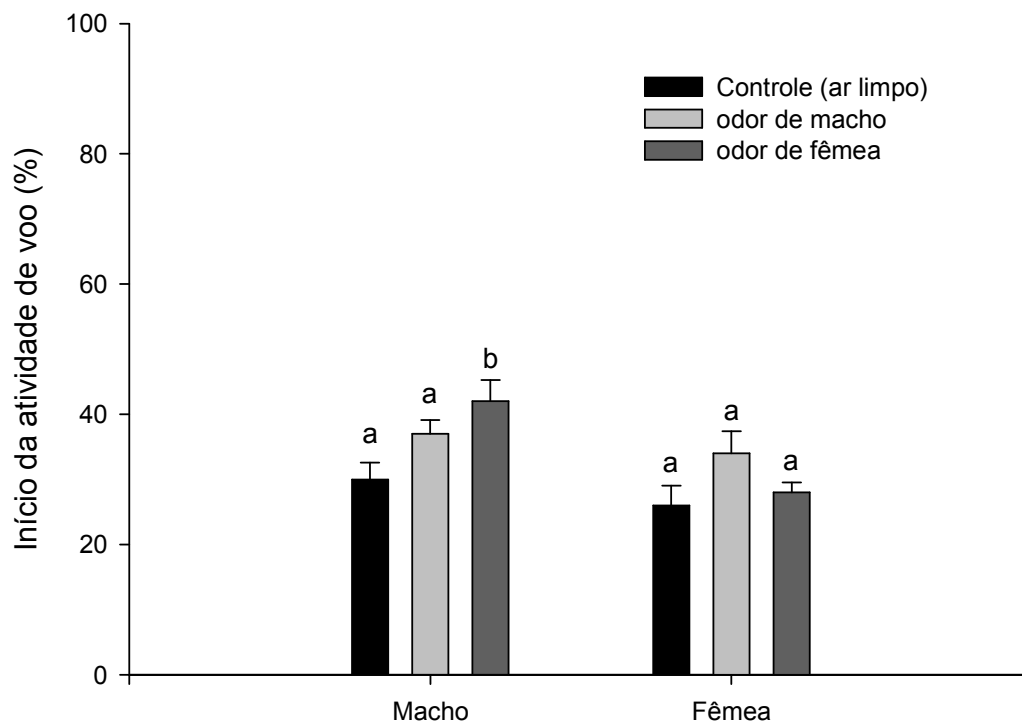
Os diferentes tratamentos testados não promoveram diferenças significativas na frequência de início de voo das fêmeas (ANOVA, n.s., Figura 15). Quando confrontadas com correntes de ar limpo, apenas 26 % das fêmeas presentes em cada ensaio iniciaram o voo. A porcentagem de fêmeas que apresentou este comportamento na presença de correntes de ar associadas com odor de fêmea ou de macho foi de 28 e 34 %, respectivamente.

O grau de orientação dos insetos em relação aos diferentes estímulos testados também foi avaliado. Quando os machos foram confrontados com correntes de ar limpo ou correntes associadas com odor de machos, a distribuição registrada para o início do voo foi uniforme, indicando que não houve orientação significativa (teste de Rayleigh, n.s., Figura 16A e 16B). Entretanto, quando os machos foram confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmea, os dados não apresentaram uma distribuição uniforme (teste de Rayleigh,  $\mu = 357,5^\circ$ ;  $r = 0,8$ ;  $P = 0,0001$ , Figura 16E). A análise de estatística circular mostrou que os machos iniciaram o voo com

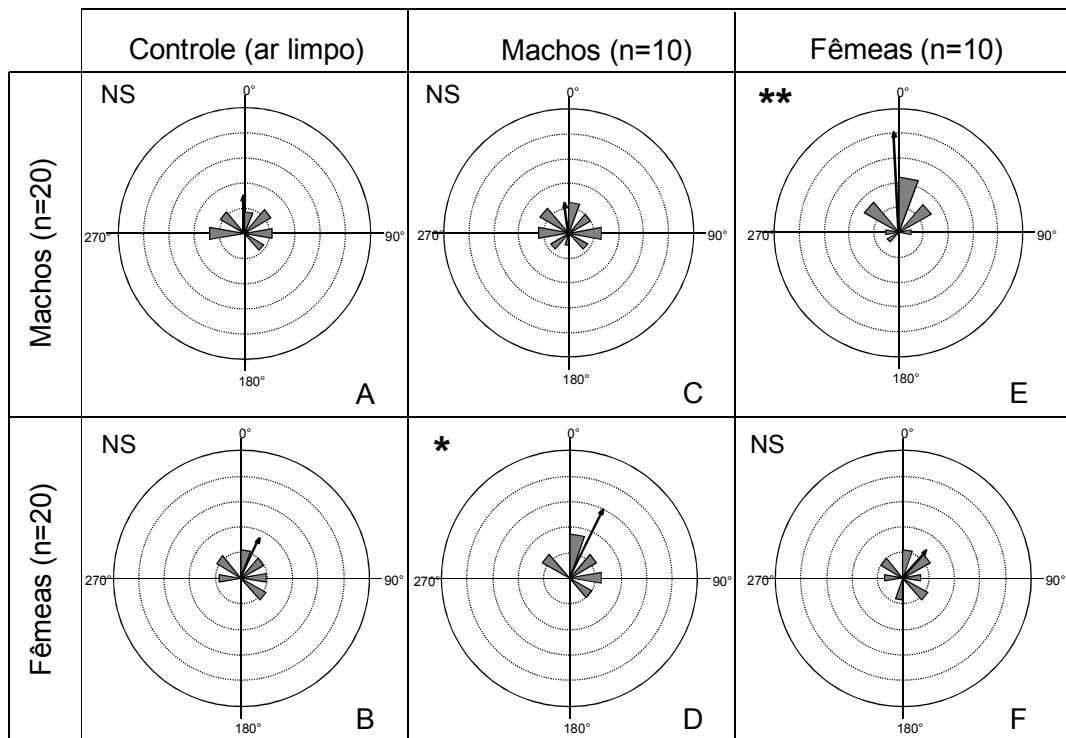
orientação significativa na direção da corrente de ar associada com odor de fêmea (teste-V,  $P \leq 0,05$ ).

Os dados dos ensaios em que fêmeas foram confrontadas com correntes de ar associadas a odor de macho não apresentaram uma distribuição uniforme (teste de Rayleigh,  $\mu = 26,6^\circ$ ;  $r=0,60$ ;  $P=0,001$ , Figura 16D). No entanto, não houve orientação das fêmeas na direção da fonte de estímulo (teste-V,  $P \geq 0,05$ ). O início da atividade de voo em fêmeas confrontadas com correntes de ar limpo ou associadas com odor de fêmeas apresentaram uma distribuição uniforme (teste de Rayleigh, n.s., Figura 16B, 16F), indicando que não houve direcionamento frente aos odores testados.

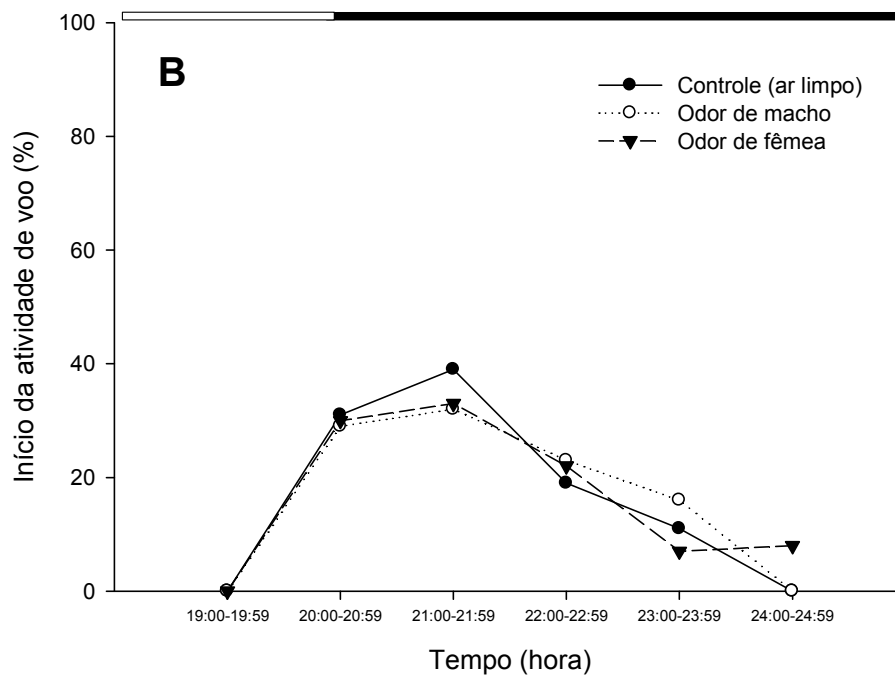
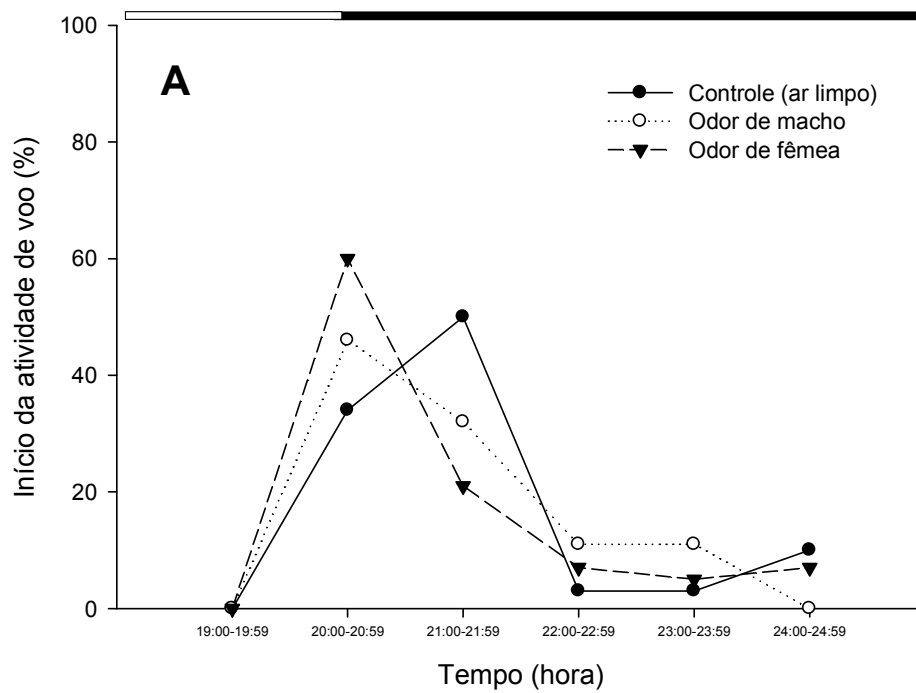
Nos experimentos foi possível determinar que durante as duas primeiras horas da fase escura houve uma maior frequência de início de voo, tanto em machos quanto em fêmeas de *T. brasiliensis* (Figura 17A e 17B).



**Figura 15.** Frequência média de início de voo em machos e fêmeas de *T. brasiliensis*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



**Figura 16.** Orientação de machos e fêmeas de *T. brasiliensis* durante o início do voo. Os diagramas em roseta representam a frequência de escolha dos ângulos correspondentes a cada intervalo de 20° dentro do círculo. As linhas no diagrama caracterizam o ângulo médio ( $\alpha\mu$ ) com intervalo de confiança de 95%. A direção da corrente de ar foi convencionalmente associada com o ângulo 0°. Resultados não significativos representam distribuição uniforme (teste de Rayleigh com  $P \geq 0.05$ ) e ausência de direcionamento (teste-V com  $P \geq 0.05$ ). \*\*Na série experimental onde os machos foram estimulados com odor de fêmeas (E), os dados não apresentaram uma distribuição uniforme (teste Rayleigh,  $P \leq 0.05$ ) e neste caso, a orientação ocorreu no sentido da fonte de estímulo (0°) (teste-V,  $P \leq 0.05$ ). \*Quando as fêmeas foram confrontadas com corrente de ar transportando odor de machos (D), os dados também não apresentaram uma distribuição uniforme (teste Rayleigh,  $P \leq 0.05$ ), no entanto, o comportamento de orientação não foi direcionado à fonte de estímulo (0°) (teste-V,  $P \geq 0.05$ ).



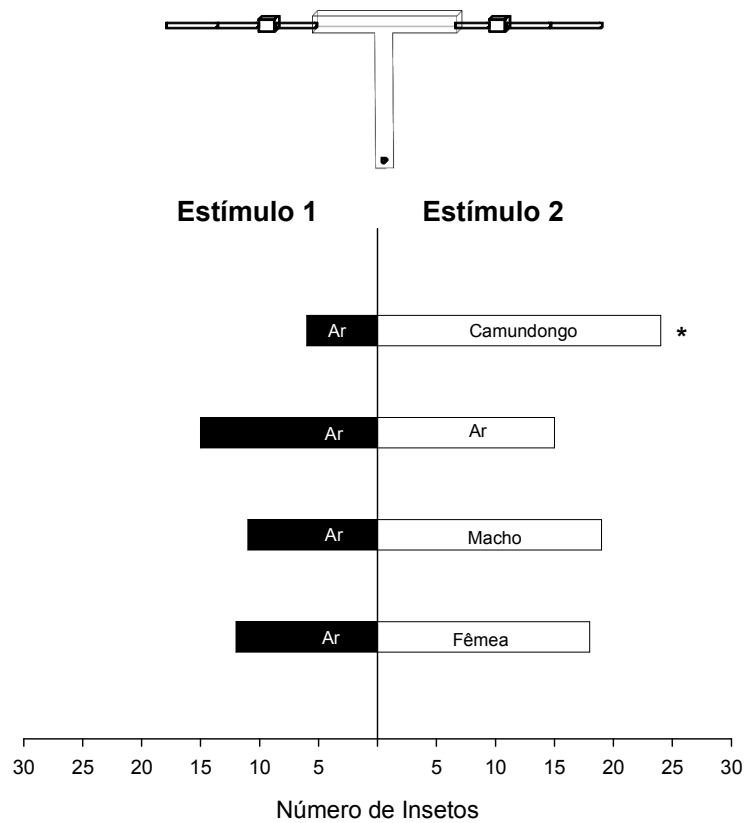
**Figura 17.** Frequência de início de voo em função do tempo em, A) machos e B) fêmeas de *T. brasiliensis*.



### **5.3 Comunicação química entre sexos em *Triatoma brasiliensis* – O papel das glândulas exócrinas**

Os testes no olfatômetro “T” revelaram a existência de uma resposta anemotática positiva em machos quando estes foram confrontados com correntes de ar associadas com odor de machos e fêmeas coespecíficos. Por outro lado, os resultados evidenciaram que fêmeas não foram atraídas por odores de outros coespecíficos nas mesmas condições experimentais (teste Binomial, n.s). No entanto, fêmeas foram atraídas por correntes de ar associadas com odor de camundongo, demonstrando que o modelo de olfatômetro utilizado neste trabalho permite detectar respostas anemotáticas em fêmeas de *T. brasiliensis* (teste Binomial,  $p < 0,001$ , Figura 18). As comparações estatísticas realizadas, quando duas correntes de ar limpo foram apresentadas simultaneamente para machos ou fêmeas, não mostraram diferenças significativas na proporção de respostas em relação aos dois braços do olfatômetro (Tabela 2).

Quando machos foram confrontados com correntes de ar associadas com odores de adultos coespecíficos (machos ou fêmeas) a atração foi significativa (teste Binomial,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0005$ , respectivamente, Figura 19). Ao testar a resposta de machos confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmeas cujas glândulas metasternais foram ocluídas não foi observada atração significativa (teste Binomial, n.s., Figura 19). Os dados obtidos com fêmeas nas quais foi aplicada parafina em outra região do tórax mostram que a perda da atratividade nesta série com oclusão das GMs não foi consequência da manipulação (teste Binomial,  $P < 0,001$ ).

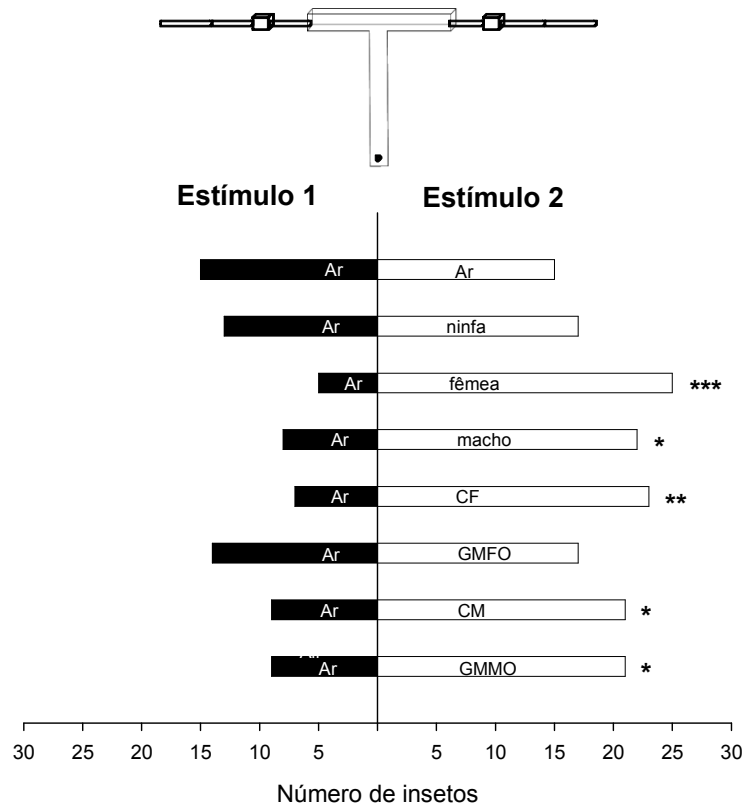


\* Teste Binomial,  $P < 0,001$

n = 30 insetos por série

Estímulo = 2 insetos por ensaio (modificado a cada ensaio)

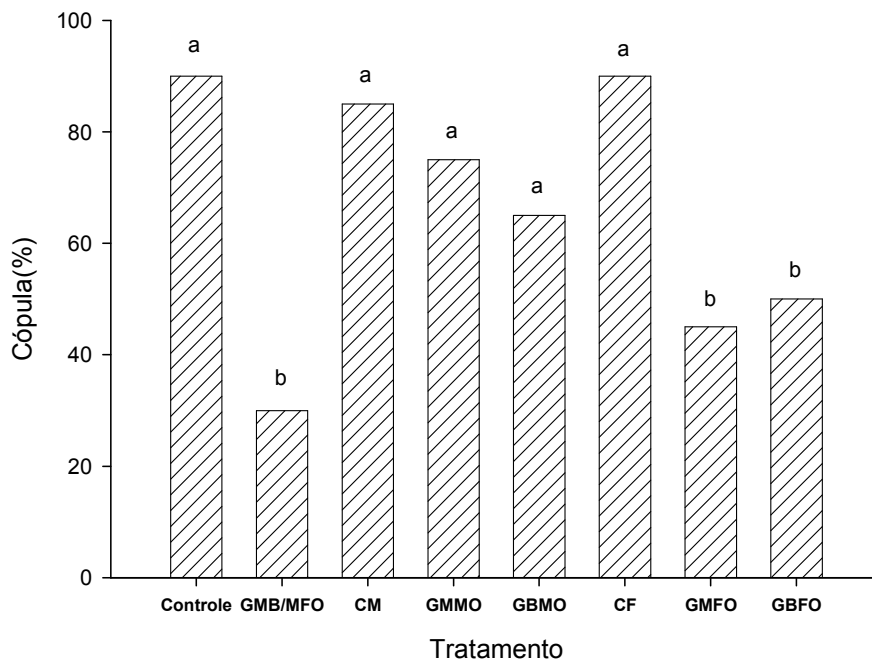
**Figura 18.** Respostas de fêmeas de *T. brasiliensis* no olfatômetro em "T".



\* teste Binomial,  $P < 0,01$   
 \*\* teste Binomial,  $P < 0,001$   
 \*\*\* teste Binomial,  $P < 0,0005$   
 n = 30 insetos por ensaio  
 Estímulo = 2 insetos por ensaio (modificado a cada ensaio)

**Figura 19.** Respostas de machos de *T. brasiliensis* no olfatômetro em "T". **GMFO**= fêmeas com o orifício das glândulas metasternais ocluído, **CF**= fêmeas tratadas com parafina em outra região da superfície do corpo (controle), **GMMO**= machos com o orifício das glândulas metasternais ocluído e **CM**= machos tratados com parafina em outra região da superfície do corpo (controle).

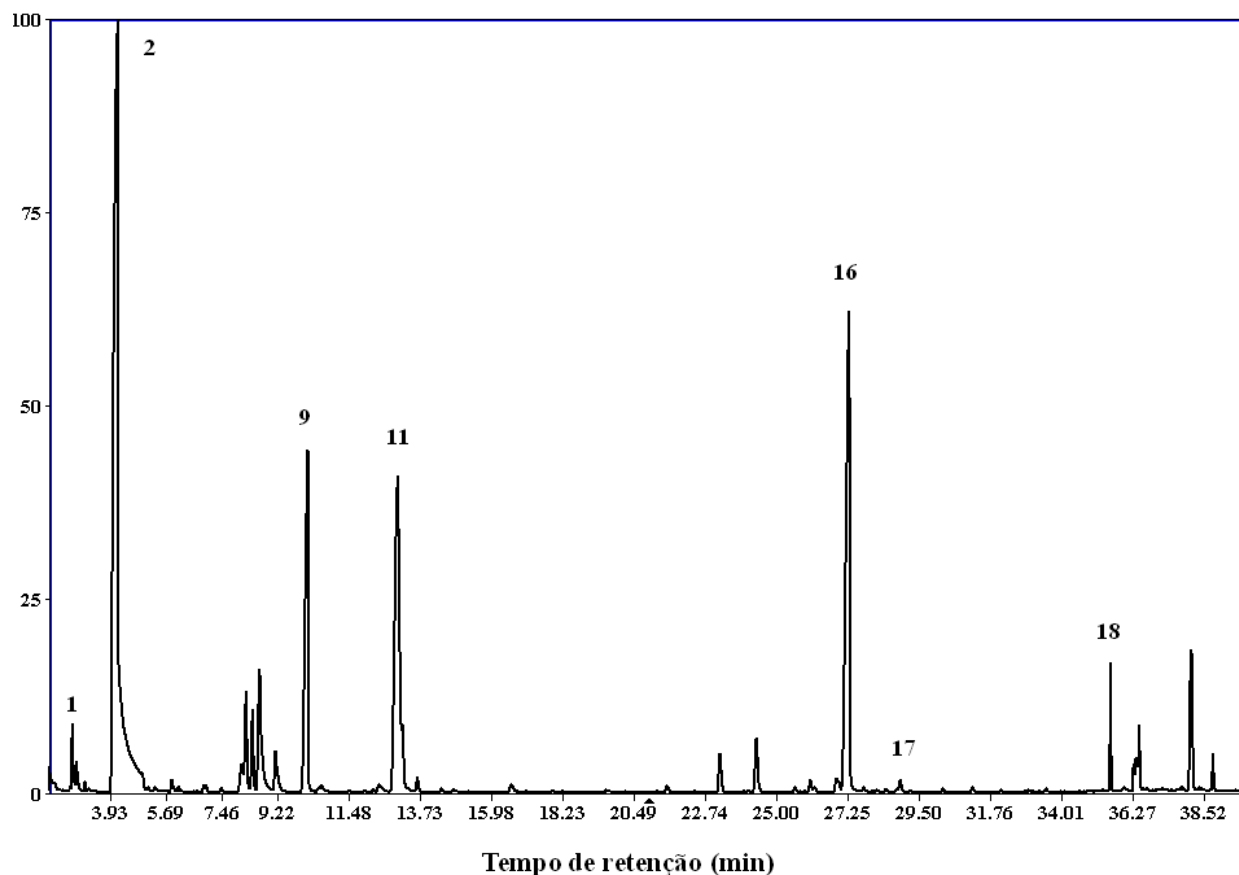
A cópula nos insetos intactos, conforme esperado, apresentou uma alta frequência (Figura 20). A oclusão com parafina das GMs de fêmea (CF) promoveu uma queda de quase 50% na frequência de cópula dos insetos (Figura 20, teste  $X^2$ ,  $p < 0,003$ ). Adicionalmente, a oclusão das GBs de fêmea provocou uma queda semelhante da ocorrência de cópula (Figura 20, teste  $X^2$ ,  $p < 0,003$ ). Por outro lado, a oclusão separada de cada par de glândulas de machos não afetou a frequência de cópula (Figura 4, teste  $X^2$ , n.s.). Finalmente, a oclusão conjunta das GBs e GMs de machos e fêmeas simultaneamente promoveu uma queda significativa na frequência de cópula, que diminuiu para 30% (Figura 20, teste  $X^2$ ,  $p < 0,003$ ). Os ensaios controle para verificar se a manipulação experimental afetava a motivação de machos e fêmeas para acasalar, apresentaram 85% e 90% de ocorrência de cópula, respectivamente (Figura 20, teste  $X^2$ , n.s.).



**Figura 20.** Frequência de cópula em casais de *T. brasiliensis*: o papel das secreções das glândulas exócrinas. **Controle**= casais intactos, **CM**= machos com parafina aplicada no metatórax dorsal, sem ocluir as glândulas, **CF**= fêmeas com parafina aplicada no metatórax dorsal, sem ocluir as glândulas, **GMB/MFO**= machos e fêmeas com os orifícios das glândulas metasternais e de Brindley ocluídos, **GMFO**= fêmeas com os orifícios das glândulas metasternais ocluídos, **GMMO**= machos com os orifícios das glândulas metasternais ocluídos, **GBFO**= fêmeas com os orifícios das glândulas de Brindley ocluídos e **GBMO**= machos com os orifícios das glândulas de Brindley ocluídos. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas (teste  $X^2$  seguido de comparações múltiplas de Bonferroni,  $P < 0,003$ ).

#### **5.4 Respostas eletrofisiológicas da antena de machos de *Triatoma brasiliensis* aos odores da glândula metasternal de fêmeas**

Inicialmente, este estudo identificou a secreção produzida pelas glândulas metasternais de adultos de *T. brasiliensis* através de CG-EM (Figura 21). Nossos resultados mostram que as glândulas metasternais de *T. brasiliensis* estão envolvidas na síntese de substâncias voláteis (Tabela 2). Estas glândulas produzem basicamente cetonas, dioxolanos e álcoois, sendo que o principal constituinte encontrado nas glândulas de ambos os sexos foi a 3-pentanona. Outros compostos abundantes identificados foram o 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano, o 3-pentanol, o 2S-metil-1-butanol e o 4-metil-1-heptanol (Figura 21). O perfil cromatográfico apresentado na Figura 21 ilustra apenas algumas substâncias identificadas que correspondem aos compostos mais abundantes produzidos pelas glândulas metasternais (GMs) da espécie.



**Figura 21.** Perfil cromatográfico das substâncias produzidas pelas glândulas metasternais de fêmeas de *T. brasiliensis* (amostra com 08 GMs) identificados por meio da CG/EM (Shimadzu 17A, Shimadzu 5050A). Foram representados apenas os compostos mais abundantes. Os picos correspondentes são **1**: 2-butanona, **2**: 3-pentanona, **9**: 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano **11**: (2S)-metil-1-butanol, **16**: (4R)-metil-1-heptanol, **17**: desconhecido e **18**) (1R)-feniletanol. A lista completa pode ser vista na tabela 1.

**Tabela 2.** Compostos identificados nas glândulas metasternais (GMs) de fêmeas de *T. brasiliensis* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

n <sup>o</sup>	Composto	TR <sup>a</sup>	Índice de Retenção <sup>b</sup>	Quantidade Relativa
1	2-butanona	2,52	909	*/**
2	3-pentanona	3,80	987	*****
3	(2S)-butanol#	5,03	1033	*
4	2-metil-1-propanol*	7,65	1113	*
5	4-etil-2-isopropil-5-metil-1,3-dioxolano I##	7,79	1116	*
6	4-etil-2-isopropil-5-metil-1,3-dioxolano II##	7,98	1120	*
7	3-pentanol	8,30	1127	****/*****
8	(2R)-pentanol#	8,72	1136	*/**
9	2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano##	9,64	1156	***
10	(3R/S)-hexanol	11,90	1205	*
11	(2S)-metil-1-butanol	12,41	1215	**/**
12	3-metil-2-hexanol###	16,04	1287	*
13	(4R)-metil-1-hexanol	22,61	1421	*
14	1-heptanol	23,78	1446	*/**
15	6-metil-1-heptanol	26,30	1500	*
16	(4R)-metil-1-heptanol	26,65	1508	****/*****
17	desconhecido	28,32	1548	*
18	(1R)-feniletanol	35,27	1816	*/**

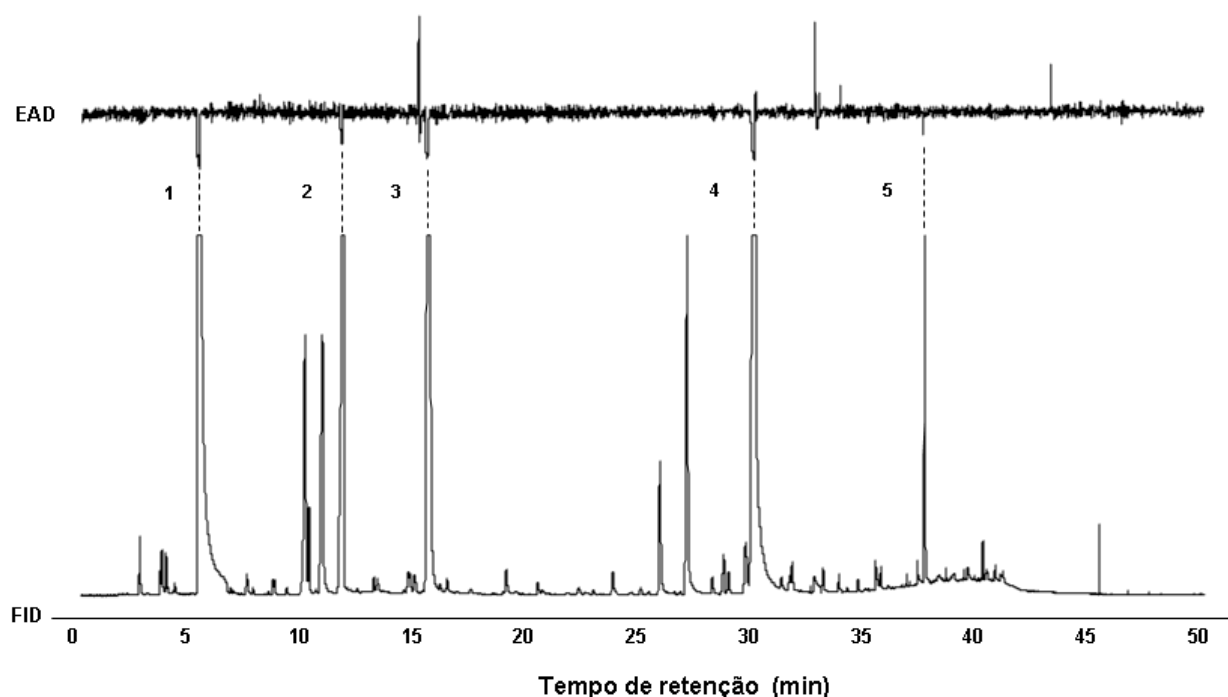
<sup>a</sup> Tempo de retenção (Coluna SupelcoWax-10).

<sup>b</sup> Os índices de retenção foram calculados de acordo com o Índice de Kováts (1965).

Quantidade relativa: \*\*\*\*\* = >20%, \*\*\*\* = 10-20%, \*\*\* = 5-10%, \*\* = 2-5%, \* = >2% do total de compostos (área do pico no GC), # = resultados não conclusivos, ## = forma *cis* presente, ### = todos os isômeros estão presentes na glândula.



No estudo de eletrofisiologia, das 7 antenas de machos testadas, 100% responderam consistentemente à 3-pentanona, 71% ao (4*R*)-metil-1-heptanol, 28% ao (2*S*)-metil-1-butanol e (1*R*)-feniletanol e 14% das antenas testadas responderam ao 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano (Figura 22). É válido ressaltar que o composto representado como desconhecido e que apresentou índice de Kováts 1548 promoveu respostas eletrofisiológicas em 3 das 7 preparações testadas.



**Figura 22.** Respostas simultâneas do CG (FID) e de uma antena de macho de *T. brasiliensis* frente aos componentes da secreção das glândulas metasternais (10) de fêmea. Os diferentes compostos são: **1)** 3-pentanona, **2)** 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano, **3)** (2*S*)-metil-1-butanol, **4)** (4*R*)-metil-1-heptanol e **5)** (1*R*)-feniletanol.

## **5.5 Comportamento de cópula e associação pós-acasalamento em *Triatoma brasiliensis***

### 5.5.1 Comportamento sexual

Para a descrição qualitativa dos comportamentos foram considerados os padrões motores exibidos tanto pelos machos quanto pelas fêmeas.

#### a) Comportamento do macho durante o acasalamento

Após um curto período de exploração da arena, os machos tentaram copular realizando uma sequência que frequentemente incluiu cinco padrões motores:

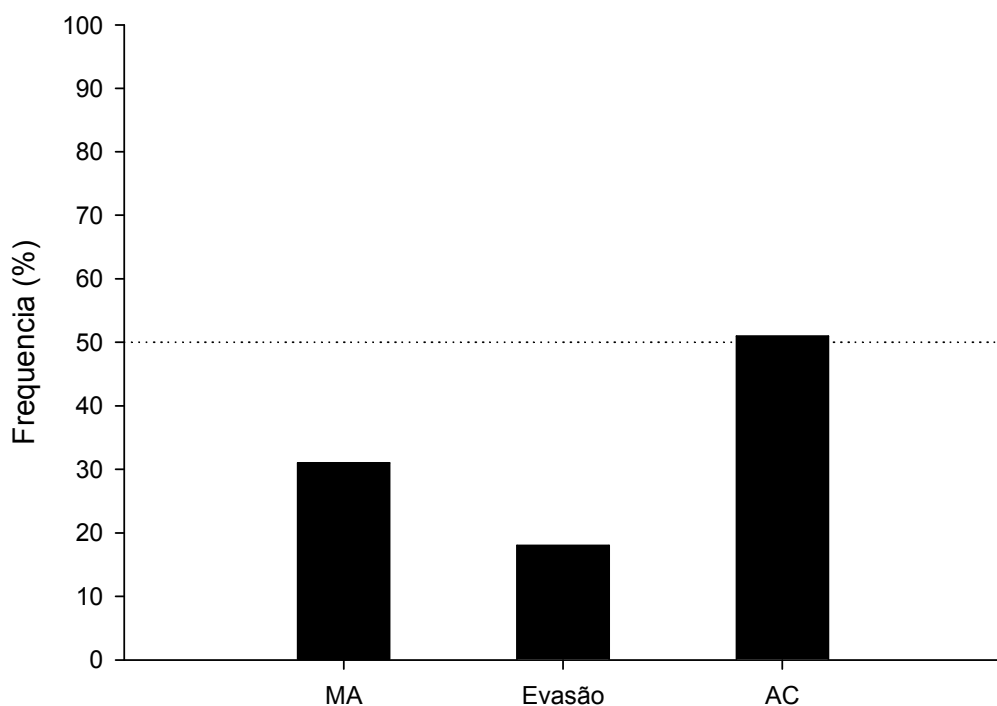
1. Posição vigilante: o macho deixa de caminhar e move suas antenas em direção à fêmea.
2. Salto: o macho se aproxima da fêmea caminhando, salta repentinamente e se coloca sobre o dorso desta. Houve toque simultâneo de ambas as extremidades das antenas do macho, na região dorsal da cabeça e do pronoto da fêmea.
3. Posição dorso-lateral: o macho se posiciona dorsolateralmente sobre a fêmea. Após assumir esta posição, o macho normalmente expõe a sua genitália.
4. Cópula: já em posição lateral, o macho se aproximava da porção posterior do abdômen da fêmea utilizando seu terceiro par de patas. Os parâmeros do macho auxiliam na fixação da sua genitália em relação à da fêmea, permitindo a introdução do edeago. Os insetos permaneceram nesta posição durante  $6 \pm 8$  min.
5. Pós-cópula (separação): ocorre a separação das genitálias. Neste momento, o macho pode apresentar três tipos de comportamento. Em primeiro lugar, o macho pode tentar copular uma segunda vez. Alternativamente, o macho pode permanecer sobre o dorso da fêmea em uma associação pós-copulatória (APA). Finalmente, na maioria dos casos, o macho desce e se afasta da fêmea.

b) Comportamento de rejeição das fêmeas durante o acasalamento

Frente às tentativas de cópula realizadas pelos machos, as fêmeas não receptivas podiam responder exibindo três padrões motores de rejeição:

1. Movimentos abdominais: a fêmea move suas patas e seu corpo para baixo e para cima repetidamente.
2. Achatamento corporal: a fêmea achata seu corpo contra o substrato e realiza movimentos laterais rápidos, de maneira que o macho não consegue se posicionar sobre a região lateral da fêmea, ficando impossibilitado de alcançar a genitália feminina.
3. Evasão: a fêmea se afasta em resposta à tentativa do macho, deslocando-se brusca e rapidamente.

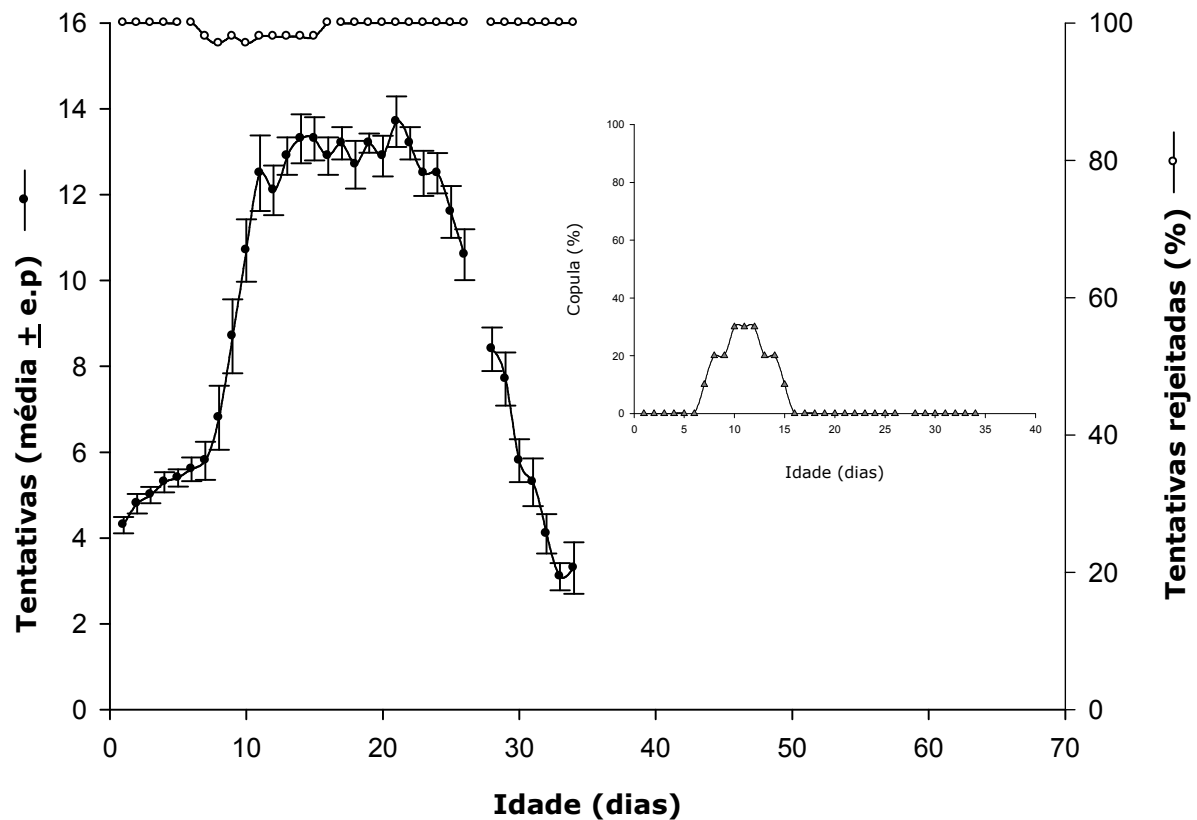
A Figura 23 representa a frequência de ocorrência dos diferentes tipos de rejeição. As rejeições por achatamento corporal foram mais frequentes, seguidas pelos movimentos abdominais e a evasão.



**Figura 23.** Frequência relativa dos diferentes tipos de comportamento de rejeição apresentados por fêmeas (MA: movimentos abdominais, AC: achatamento corporal).

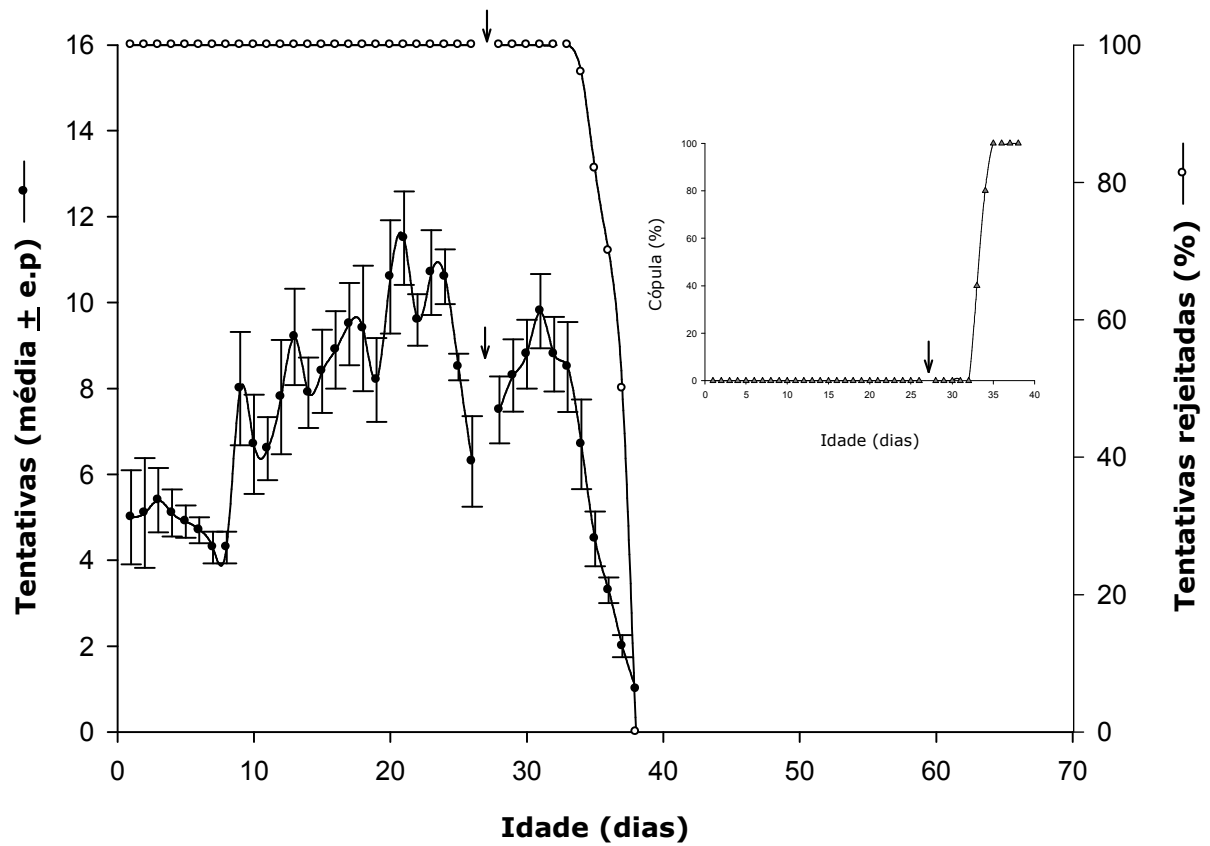
### 5.5.2 Maturação sexual e frequência de acasalamento

Este experimento foi proposto para analisar o efeito da idade e do estado nutricional na maturação sexual de *T. brasiliensis*. O número de tentativas copulatórias realizadas pelos machos variou em função da idade (Figura 24). Durante os primeiros dez dias, em todos os tratamentos, os machos realizaram aproximadamente cinco tentativas por ensaio, com um pequeno aumento na frequência ao longo deste período. Após completar 10 dias de idade, as tentativas de cópula realizadas pelos machos aumentaram drasticamente, alcançando aproximadamente 12 por ensaio (Figura 24). Nestas mesmas condições (T1), fêmeas não alimentadas mostraram uma tendência a rejeitar as tentativas realizadas pelos machos.



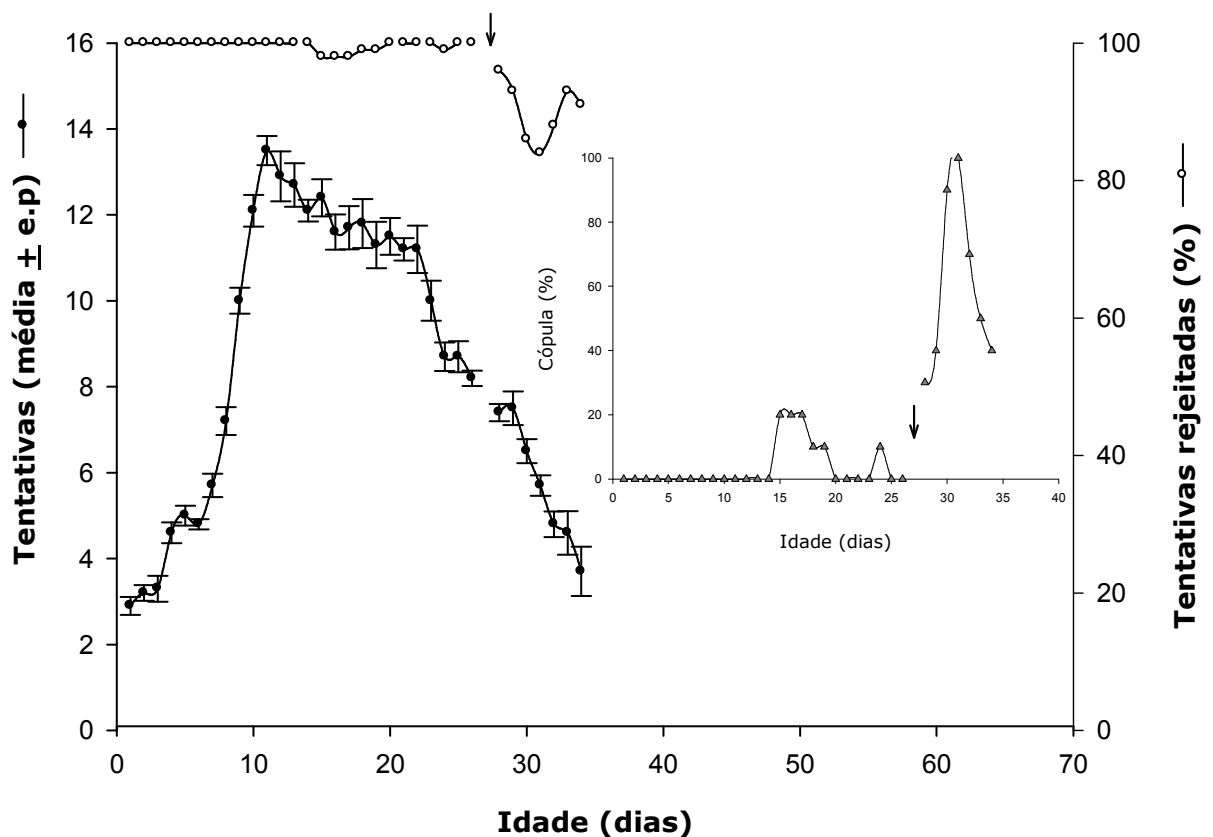
**Figura 24.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópula no tratamento com machos e fêmeas em jejum (T1). O gráfico inserto: representa a frequência diária de cópulas em função da idade.

No segundo tratamento, com machos e fêmeas alimentados (T2), os machos tentaram copular a partir do primeiro dia, mas foram consistentemente rejeitados pelas fêmeas (Figura 25). Apesar disso, neste tratamento (T2), todas as fêmeas aceitaram acasalar a partir do sétimo dia após a alimentação (Figura 25, gráfico inserto).



**Figura 25.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos e fêmeas alimentados (T2). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópulas em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo.

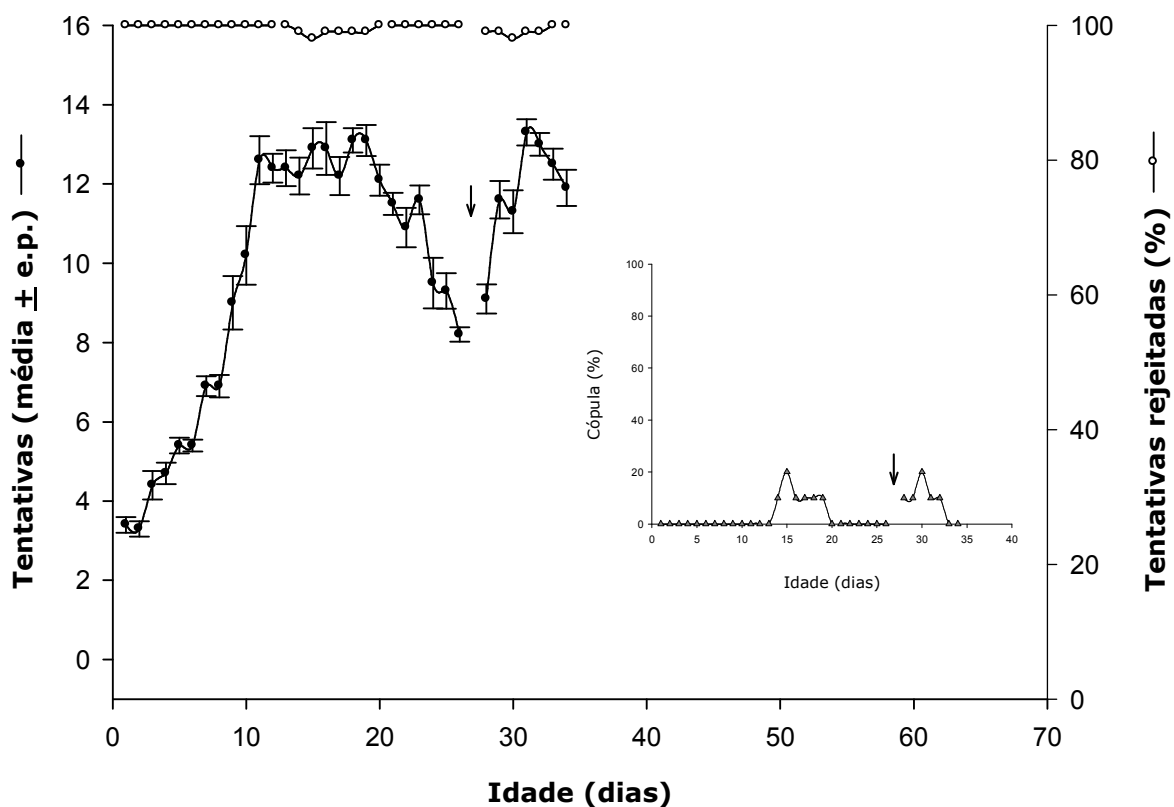
Assim como em T1 (machos e fêmeas em jejum), os machos não alimentados de T3 (machos em jejum e fêmeas alimentadas) apresentaram um perfil similar de tentativas de cópula (Figura 26). Todas as fêmeas deste tratamento (T3) também aceitaram copular, aproximadamente a partir do sexto dia após alimentação (Figura 26, gráfico inserto). Vale ressaltar que neste tratamento (T3) alguns machos começaram a morrer após 31 dias de jejum. Dos 10 machos testados, 4 tinham morrido no final desta série experimental. Além disso, neste tratamento (T3), apesar de ter sido registrado 100% de cópula, as fêmeas mostraram um alto número de rejeições em resposta às tentativas dos machos, inclusive alguns dias depois da alimentação (Figura 26). Vale ressaltar que nestas condições, as tentativas de cópula somente foram aceitas depois de repetidas rejeições. Pelo contrário, em T2 (machos e fêmeas alimentados), nas mesmas condições de jejum as fêmeas aceitaram acasalar sem executar nenhuma rejeição (Figura 25).



**Figura 26.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos em jejum e fêmeas alimentadas (**T3**). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópula em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo.

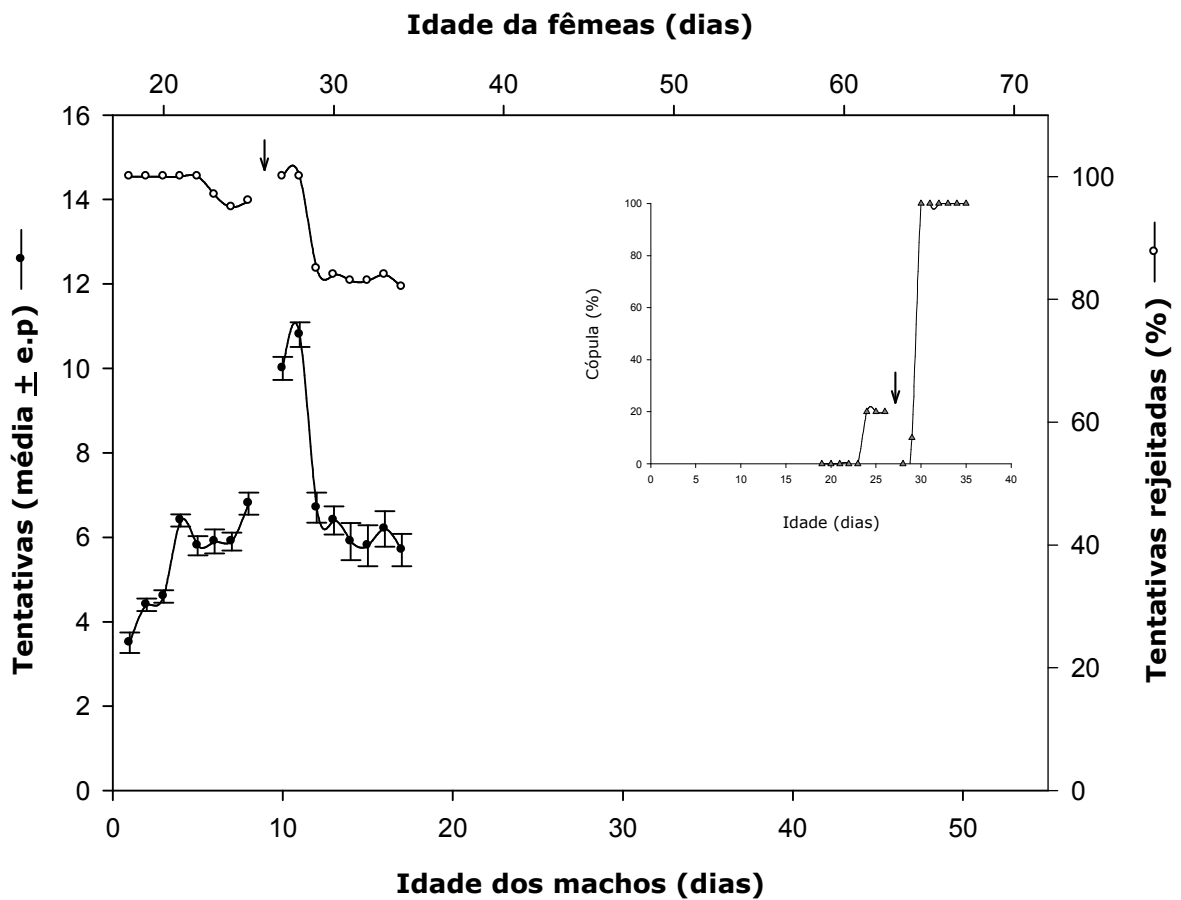
Os machos de T4 (machos alimentados e fêmeas em jejum) continuaram a mostrar um perfil similar de tentativas de cópula no período pré alimentação (Figura 27). As fêmeas não mostraram um grau relevante de aceitação de cópula nestas condições, se comportando de maneira similar à observada em T1 (Figura 27, gráfico inserto).





**Figura 27.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos alimentados e fêmeas em jejum (T4). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópulas em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo.

Finalmente, o tratamento T5 mostrou que a idade dos machos não afetou a aceitação de cópula pelas fêmeas, como observado no T3 (machos em jejum e fêmeas alimentadas). Machos jovens não alimentados usados no T5 estavam prontos para acasalar e mesmo assim as fêmeas rejeitaram suas tentativas. Neste caso, verificou-se que 100% dos casais copularam vários dias após as fêmeas terem realizado o repasto (Figura 28, gráfico inserto).



**Figura 28.** Número de tentativas de cópula, porcentagem de rejeições e frequência de cópulas no tratamento com machos jovens em jejum e fêmeas alimentadas (**T5**). O gráfico inserto representa a frequência diária de cópulas em função da idade e do estado nutricional. As setas indicam o dia em que foi oferecido o repasto sanguíneo.

### 5.5.3 Poliandria e associação pós-acasalamento (APA)

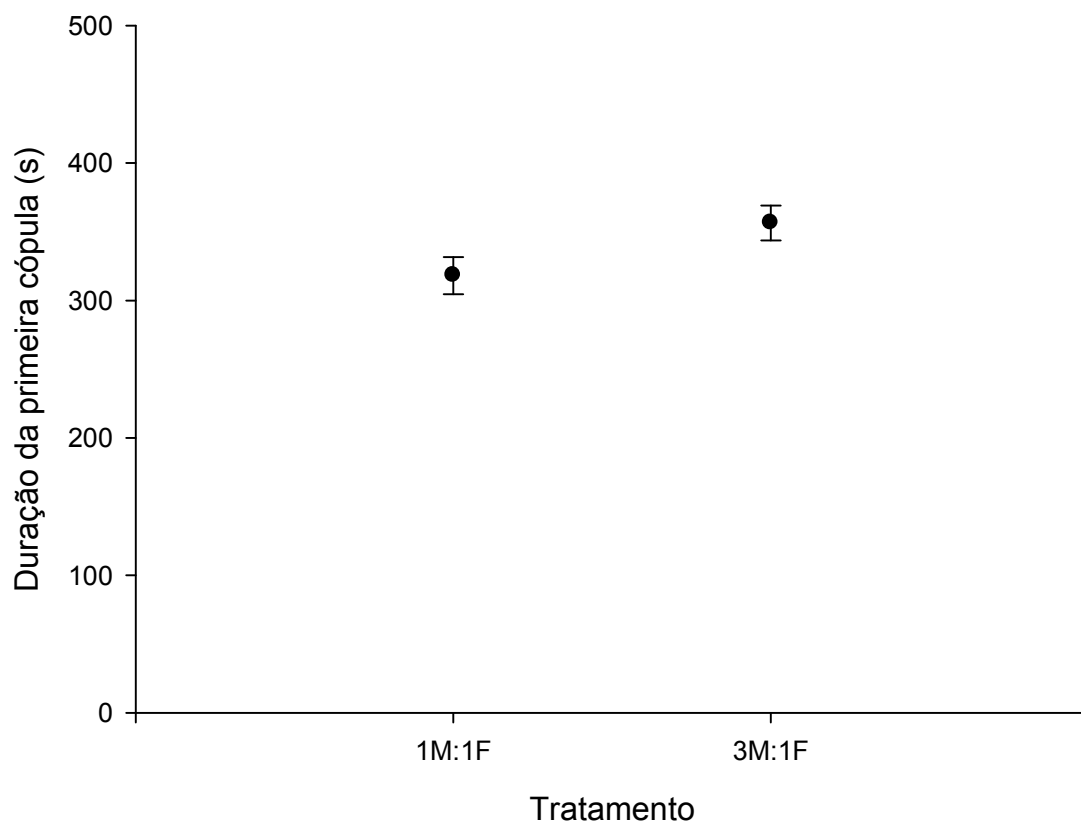
Os resultados mostraram que 70% das fêmeas testadas aceitaram copular com todos os três machos apresentados em um intervalo de 90 minutos. Além disso, foi observado que o 30% das fêmeas restantes aceitou copular somente com dois machos. Portanto, nenhuma fêmea copulou com apenas um macho em nossas condições experimentais. Além disso, observou-se que 100% das fêmeas acasalaram com o primeiro e o segundo macho introduzido na arena.

Para comparar a duração (segundos) da primeira cópula entre os diferentes tratamentos (1M:1F x 3M:1F x 3M:1F-) foi utilizado o teste *t* Student para amostras independentes. Neste caso, os dados correspondentes à duração da primeira cópula nos tratamentos 3M:1F e 3M:1F- foram reunidos em um só dado. Isto foi possível porque a primeira cópula em ambos os tratamentos ocorreu em condições experimentais idênticas. A duração da primeira cópula não foi significativamente afetada quando comparada entre casais individuais e grupos de 3 machos e uma fêmea (teste *t*, n.s., Figura 29).

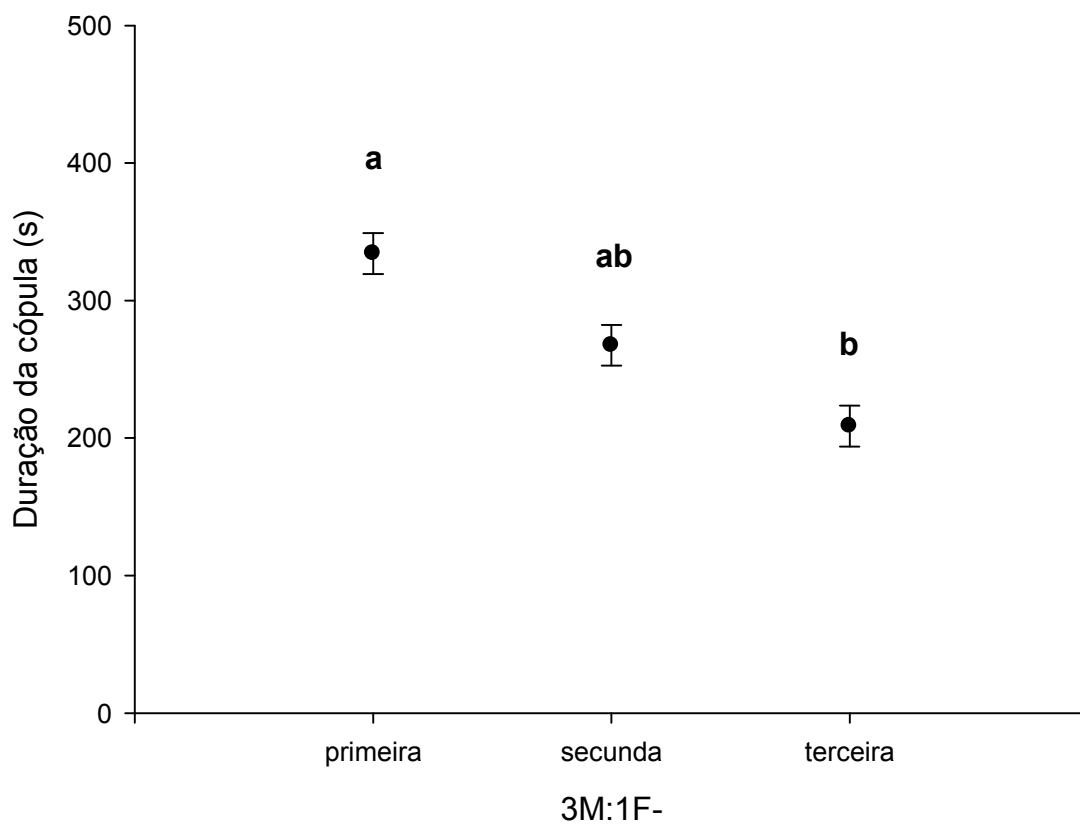
A duração da cópula variou significativamente de acordo com a sequência de acasalamento nas séries contendo grupos de 3 machos e uma fêmea (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0.001$ ). A primeira cópula no tratamento 3M:1F- apresentou uma duração média de  $334 \pm 16$  s, enquanto a segunda cópula durou em média  $267 \pm 16$  s e a terceira apresentou uma duração média de  $209 \pm 17$  s. A comparação *post-hoc* destes dados mostrou que a primeira cópula foi significativamente mais longa que a terceira (teste Tukey,  $P < 0.0001$ , Fig. 30). Ao comparar a duração da segunda cópula com a primeira e a terceira não foram observadas diferenças significativas (teste Tukey, n.s., Figura 30). No tratamento 3M:1F não foi observado mais de duas cópulas por ensaio, neste caso, para comparar a duração entre a primeira e a segunda cópula foi utilizado o teste *t* Student.

Neste caso, a primeira cópula apresentou duração média de  $379 \pm 17$  s, enquanto a segunda variou em média  $349 \pm 24$  s (teste *t*, n.s.). Vale ressaltar que não foi observada terceira cópula nesta série experimental.

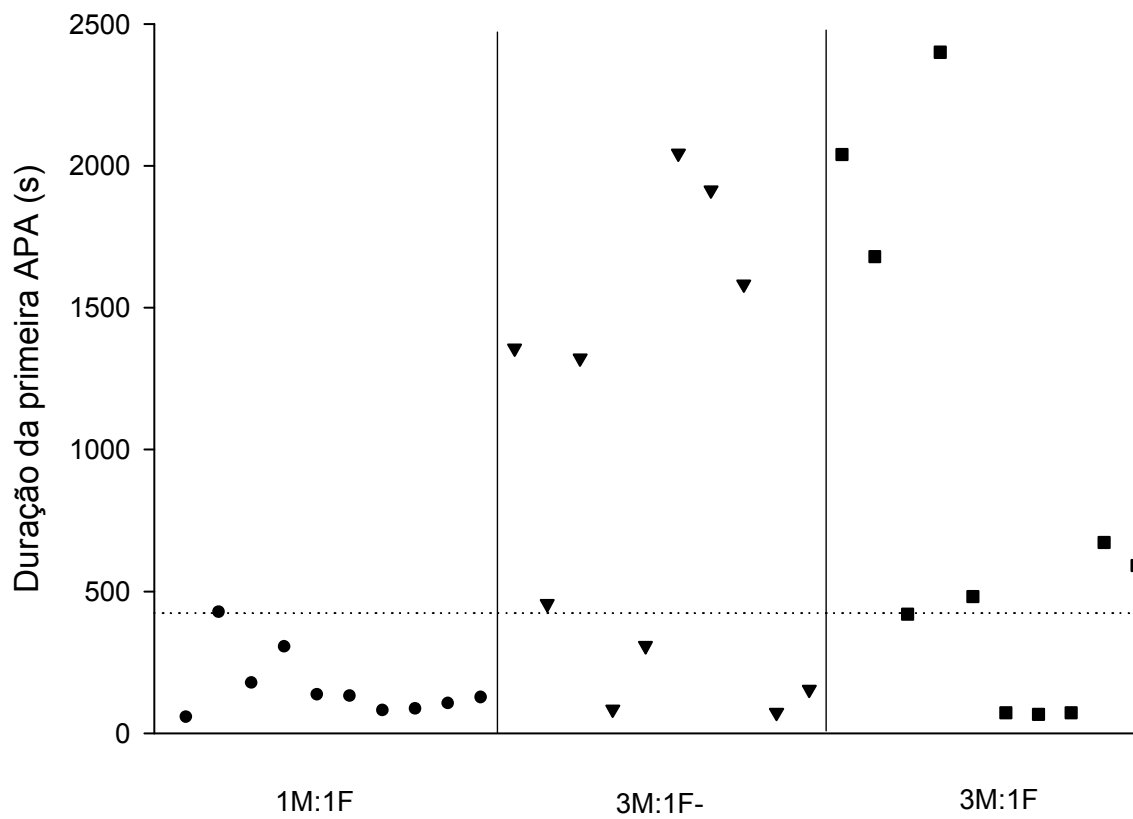
Após observar, durante nossos experimentos de descrição do comportamento sexual, que os machos permaneciam associados à fêmea imediatamente após a cópula, decidimos mensurar a duração desta associação na presença de outros machos. Para isso, a duração da associação pós-cópula foi testada entre os diferentes tratamentos 1M:1F, 3M:1F e 3M:1F-. Para comparar a duração (segundos) das primeiras associações pós-acasalamento entre os diferentes tratamentos (1M:1F x 3M:1F x 3M:1F-) foi utilizado o teste de Kruskal Wallis e nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 31). No entanto, é importante ressaltar que a duração da associação pós-acasalamento (APA) no tratamento 1M:1F foi notadamente baixa e restrita a uma duração máxima de 424 segundos, enquanto que nos tratamentos 3M:1F e 3M:1F- alguns machos apresentaram associações consideravelmente longas (Figura 31). Estas associações longas podem ter sido a causa da diminuição na frequência de cópula nos grupos, uma vez que no tratamento 3M:1F- foi registrado 80% de terceiras cópulas e apenas 50% de segundas cópulas e nenhuma terceira cópula no tratamento 3M:1F (Figuras 32 e 33).



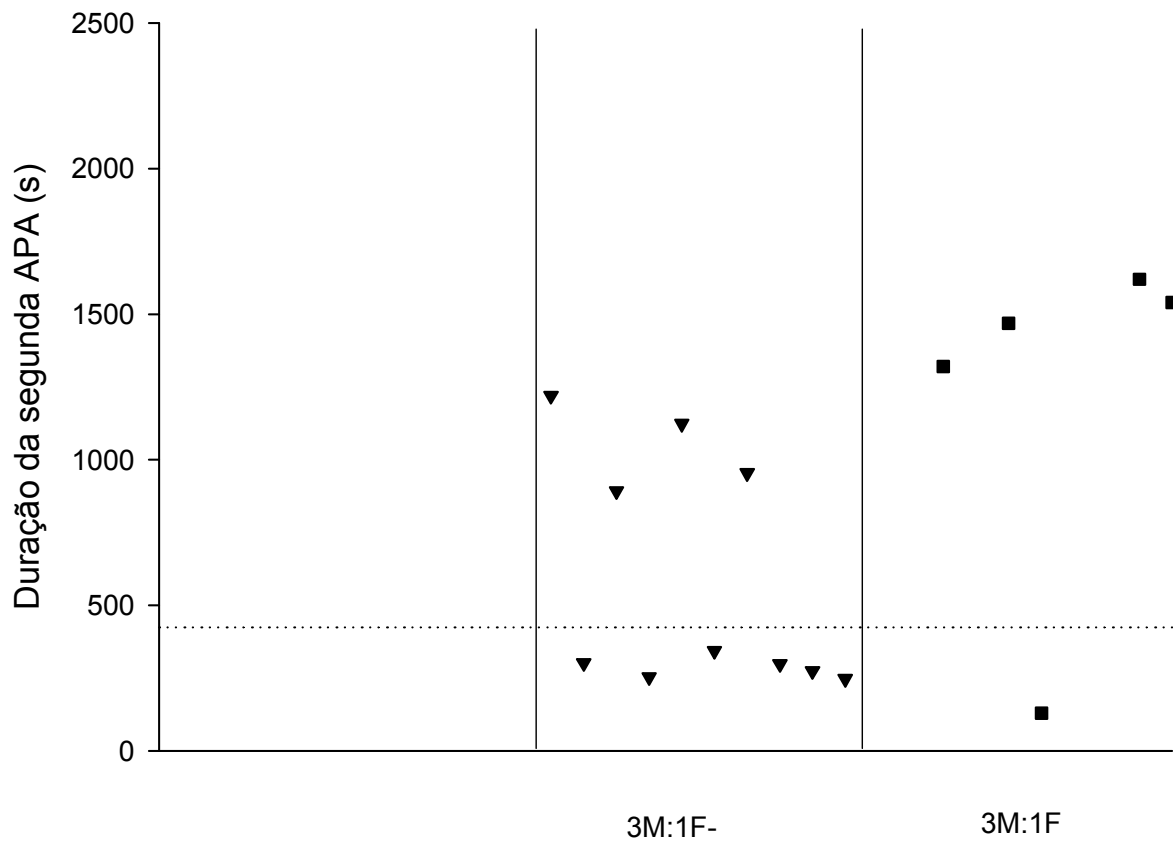
**Figura 29.** Duração da primeira cópula nos tratamentos 1M:1F e 3M:1F.



**Figura 30.** Duração da cópula no primeiro, segundo e terceiro acasalamento da série 3M:1F-.

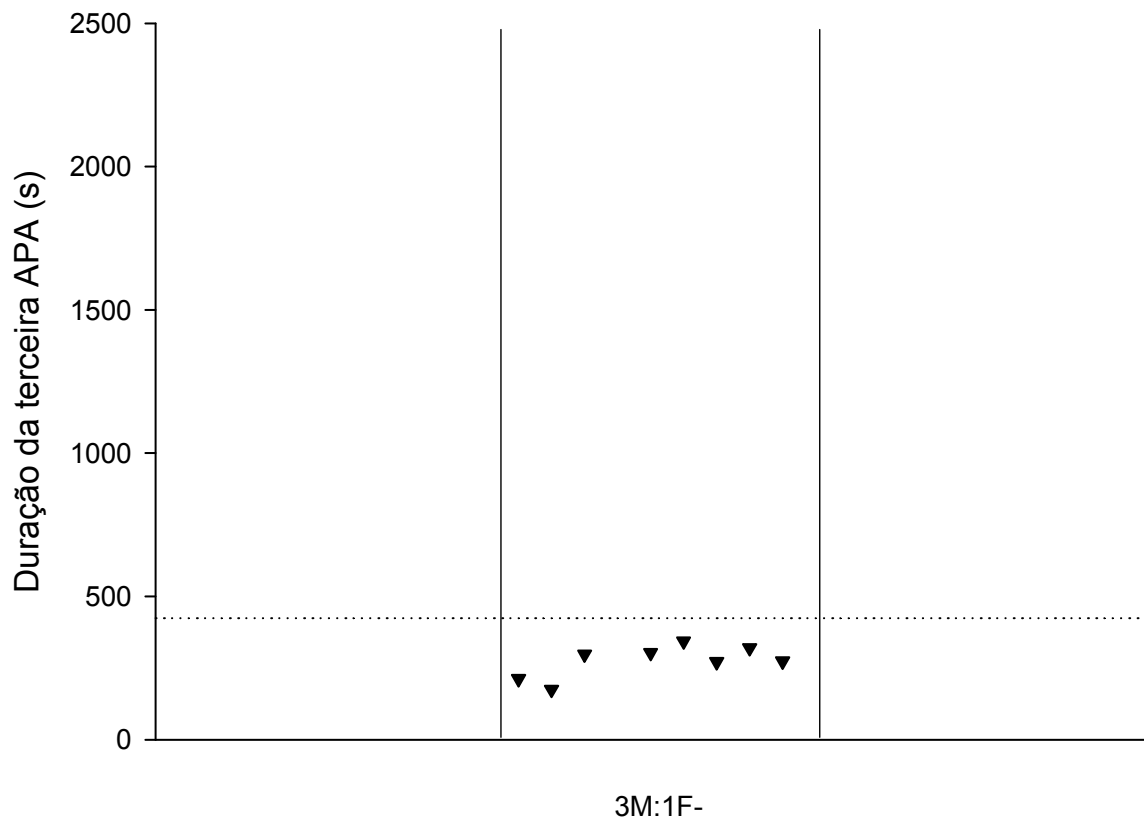


**Figura 31.** Duração da primeira associação pós-acasalamento (APA) nas diferentes séries experimentais. A linha pontilhada indica a duração máxima da APA na série 1M:1F.



**Figura 32.** Duração da segunda associação pós-acasalamento (APA) nas diferentes séries experimentais. A linha pontilhada indica a duração máxima da APA na série 1M:1F.





**Figura 33.** Duração da terceira associação pós-acasalamento (APA) nas diferentes séries experimentais. A linha pontilhada indica a duração máxima da APA na série 1M:1F.

## DISCUSSÃO

---

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Uso de abrigos por adultos de *Triatoma brasiliensis***

Nossos resultados mostram que a maior atividade de adultos de *T. brasiliensis* em relação ao abrigo ocorre em um período restrito ao início da noite (primeira hora). Os resultados demonstram que adultos desta espécie exibem um aumento do número de saídas do abrigo e uma maior atividade locomotora em torno dele no início da fase escura.

Além disso, os resultados aqui apresentados demonstram que a presença de sinais olfativos provenientes de fêmeas é capaz de promover a saída de machos do abrigo e provocar um aumento significativo da sua atividade locomotora. O número de tentativas de cópula entre machos também foi maior quando os sinais olfativos provenientes de fêmeas estavam presentes, reforçando a hipótese de que quando fêmeas estão presentes, há um sinal no ambiente relacionado com a comunicação sexual de adultos desta espécie.

Por outro lado, este trabalho mostrou que a atividade basal de fêmeas em torno do abrigo é maior que a dos machos. Isto pode estar relacionado com o fato de que fêmeas de *T. brasiliensis* estão mais receptivas para o acasalamento nas condições fisiológicas aqui testadas (sétimo dia após alimentação), do que fêmeas não alimentadas (Vitta et al. 2009, *in press*), fazendo com que elas se tornem mais ativas aumentando assim a chance de encontrar e/ou recrutar um parceiro para o acasalamento. Além disso, uma atividade mais intensa das fêmeas também pode estar relacionada com uma maior motivação para a busca de hospedeiro. Os resultados apresentados revelam informações originais sobre o uso do abrigo no contexto sexual em triatomíneos e sugerem uma organização circadiana da atividade relacionada com o uso de abrigos por adultos de *T. brasiliensis*.

Sabe-se que os triatomíneos apresentam uma organização

circadiana para muitas atividades (Ampleford & Steel 1982, Constantinou 1984, Lazzari 1991, 1992, Minoli & Lazzari 2003, Reisenman et al. 1998, 2002, Barrozo et al. 2004, Bodin et al. 2008). Estes insetos possuem um padrão de atividade bimodal (procura por hospedeiro ao anoitecer e a busca por abrigo ao amanhecer) que pode ser mediado por diferentes sinais olfatórios que geram respostas comportamentais específicas em diferentes momentos do dia (Lazzari 1992, Lorenzo & Lazzari 1996, Lorenzo & Lazzari 1998, Barrozo et al. 2004). A resposta de orientação frente a CO<sub>2</sub> em *T. infestans* e *R. prolixus* apresenta um ritmo endogenamente controlado e limitado ao começo da fase escura (Barrozo et al. 2004, Bodin et al. 2008). Ao contrário, a resposta olfatória ao feromônio de agregação de *R. prolixus* não parece ser controlada por um relógio endógeno, mas pela influência direta de variáveis externas (Bodin et al. 2008). Alguns trabalhos sugerem o uso de sinais químicos, por algumas espécies de triatomíneos, na comunicação sexual. Baldwin et al. (1971) e Manrique & Lazzari (1995) demonstraram que casais de *R. prolixus* e *T. infestans* emitem um sinal químico durante a cópula que promove a agregação de outros machos. Recentemente, foi demonstrado que fêmeas de *R. prolixus* emitem odores relacionados com o contexto sexual com maior intensidade durante as primeiras horas da fase escura (Pontes et al. 2008). No entanto, este é o primeiro relato que demonstra respostas de machos de triatomíneos a sinais químicos liberados por fêmeas em um período restrito da fase escura.

Vários estudos descrevem ritmos diários de sensibilidade sensorial em insetos e demonstram que a modulação das respostas ocorre principalmente nos sistemas visuais e olfatórios (Reisenman et al. 1998, 2002, Krishnan et al. 1999, Page & Koelling 2003). Na barata, *Periplaneta americana*, machos mantidos em um ciclo de luz/escuridão exibem um ritmo diário de resposta ao feromônio sexual liberado pela fêmea, com um pico de sensibilidade ocorrendo

durante as primeiras horas da fase escura (Hawkins & Rust 1977, Zhukovskaya 1995). A comunicação sexual em mariposas (Lepidoptera) ocorre de forma altamente sincronizada e a liberação do feromônio sexual pela fêmea, assim como o comportamento de busca do macho são finamente ajustados para acontecer durante a mesma janela temporal (Saunders et al. 2002).

Pensando em termos de seleção natural, é mais adaptativo que a resposta máxima a um determinado odor ocorra durante o período ativo do animal e que, além disso, esta resposta ocorra quando ela se torna biologicamente relevante. Isto é o que se tem observado em *R. prolixus*, onde a resposta olfatória máxima aos diferentes odores do hospedeiro coincide com a janela temporal precisa na qual o comportamento de busca por alimentação é conhecido ocorrer, ou seja, no início da fase escura (Bodin et al. 2008). Nossos resultados mostram que as fêmeas de *T. brasiliensis* são mais ativas no início da fase escura e que os machos parecem responder aos sinais químicos produzidos por elas também nesta fase, período em que eles aumentam sua atividade devido à presença dos sinais olfativos vindo delas. A partir disso, sugere-se a realização de experimentos em condições de ciclos de luz e escuridão constante para testar a hipótese de um controle endógeno da atividade de saída e locomotora em adultos desta espécie. Além disso, faz-se necessário avaliar se fêmeas desta espécie, uma vez que elas se mostram mais ativas do que os machos, principalmente nas primeiras horas da fase escura, são capazes de emitir espontaneamente um sinal sexual capaz de atrair machos para o acasalamento.

Em geral, a bibliografia existente aceita que ninfas de *T. infestans* saem dos abrigos para se alimentar durante a noite e que a atividade destes insetos em relação aos abrigos é aumentada nesta fase devido à alta motivação para a procura de hospedeiros (Lazzari 1992, Lorenzo & Lazzari 1998). Nossos resultados sugerem que o aumento significativo da atividade de machos de *T. brasiliensis* quando fêmeas

estão presentes também pode estar relacionado com a busca de uma parceira para o acasalamento, provavelmente mediada por odor. Um maior conhecimento da fisiologia sensorial e do comportamento de *T. brasiliensis* poderá possibilitar o desenvolvimento de novos métodos de controle de suas populações. O estudo da comunicação química e da maneira com que estes insetos fazem uso da informação proveniente do ambiente pode contribuir para o desenho de armadilhas e iscas dirigidas à captura e controle destes insetos.

## **6.2 Início da atividade de voo em machos de *Triatoma brasiliensis* mediado por odor de fêmea**

Este estudo descreve pela primeira vez a existência de um mecanismo de orientação anemotático e modulado por odor, durante o início do voo de triatomíneos. Nossos resultados demonstram que o voo dos machos de *T. brasiliensis* pode ser desencadeado por correntes de ar associadas com odor de fêmea e que a frequência deste comportamento é maior durante as primeiras horas da fase escura. Notadamente, machos de *T. brasiliensis* orientaram-se significativamente em direção a correntes de ar associadas com odor de fêmea.

Os resultados aqui apresentados sugerem que machos de *T. brasiliensis* são capazes de reconhecer sinais químicos a longa distância e orientar-se ativamente através do voo até a sua fonte emissora. Do ponto de vista epidemiológico, entender os fatores que disparam o voo em triatomíneos é fundamental, uma vez que a colonização de novos habitats e o mecanismo de dispersão se dá principalmente através do voo (Sjogren & Ryckman 1966, Lehane & Schofield 1976, Schofield & Matthews 1985, Vazquez-Prokopec et al. 2004, Ceballos et al. 2005).

Apesar de ter sido observada uma frequência semelhante na atividade inicial de voo tanto em machos quanto em fêmeas, quando uma corrente de ar limpo foi apresentada, somente os machos

aumentaram significativamente esta atividade quando uma corrente de ar associada a odor de fêmea foi apresentada. Pontes *et al.* (2008) demonstraram que adultos de *R. prolixus* emitem espontaneamente o conteúdo das suas GMs durante a noite. Adicionalmente, esses autores mostraram que esta emissão é mais frequente em fêmeas do que em machos. O comportamento de chamamento é bem conhecido em fêmeas de lepidópteros e é caracterizado pela projeção do abdome, exposição das glândulas e emissão do feromônio no ambiente (Butenandt *et al.* 1959, West & Bowers 1994). Sabe-se que a alimentação pode afetar alguns aspectos da produção de feromônios em fêmeas de várias espécies de insetos (Chapman 1998). Deste modo, sugere-se avaliar a existência de emissão espontânea em fêmeas de *T. brasiliensis* e verificar se a alimentação, idade ou estado de acasalamento, i.e., insetos acasalados ou não, podem afetar este comportamento.

Os triatomíneos possuem uma clara organização temporal do seu comportamento (Ampleford & Steel 1982, Constantinou 1984, Lazzari 1992, Minoli & Lazzari 2003, Barrozo *et al.* 2004, Lazzari *et al.* 2004, Bodin *et al.* 2008, Guerenstein & Lazzari 2008). A motivação de machos para responder aos sinais sexuais emitidos por fêmeas poderia também ser um processo modulado por um mecanismo de relógio circadiano. Nossos resultados sugerem que o voo de machos em resposta aos odores de fêmeas é limitado a uma janela temporal no começo da noite. Porém, novos experimentos deverão ser realizados para testar esta hipótese. Coincidentemente, a presença de fêmeas nas proximidades de abrigos ocupados por machos de *T. brasiliensis* é capaz de promover a saída destes e provocar um aumento significativo na sua atividade locomotora também no início da noite (item 1). Mais uma vez, verifica-se a necessidade de realizar experimentos em condições de escuridão constante para testar a hipótese de um controle endógeno da resposta olfatória em adultos desta espécie.

Finalmente, este capítulo apresenta evidências demonstrando que a presença de uma corrente de ar limpo não é suficiente para desencadear um voo orientado em adultos de *T. brasiliensis*. Os dados sugerem que é necessária a presença de um odor, biologicamente relevante, para que haja uma resposta orientada em machos desta espécie. A orientação dos machos somente foi estimulada na presença de fêmeas, provavelmente devido a sinais químicos voláteis capazes de permitir o encontro entre parceiros sexuais a longa distância.

### **6.3 Comunicação química entre sexos em *Triatoma brasiliensis* – O papel das glândulas exócrinas**

O presente trabalho avaliou a existência de mecanismos de comunicação entre sexos mediados por odor e a relevância das glândulas metasternais e de Brindley na ocorrência de cópula em *T. brasiliensis*.

O envolvimento das glândulas metasternais na comunicação sexual de triatomíneos foi proposto por Manrique et al. (2006) e Pontes et al. (2008). Baseado neste fato, nós trabalhamos com a hipótese de que os produtos das glândulas metasternais de *T. brasiliensis* poderiam mediar mecanismos de comunicação sexual. Os resultados demonstraram que machos foram significativamente atraídos por correntes de ar associadas com odor de fêmea. Adicionalmente, resultados semelhantes foram observados quando machos foram confrontados com correntes de ar associadas com odor de macho. Esses dados indicam que fêmeas e machos emitem sinais que promovem a orientação de machos e também a localização da fonte emissora. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos no ítem 2 desta tese, no qual demonstram que machos são capazes de se orientar e iniciar o voo quando confrontados com correntes de ar associadas com odor de fêmea.



Quando foi testada a secreção das glândulas metasternais na orientação de machos no olfatômetro, verificamos que a oclusão dos orifícios das GMs de fêmeas levou a uma perda de atração nos machos, confirmando a hipótese do envolvimento das glândulas metasternais de fêmeas na produção de substâncias que promovem a atração dos machos nesta espécie. Entretanto, a oclusão dos orifícios das GMs de machos não afetou a atração dos insetos deste sexo, indicando que existe outra fonte de odor nos machos capaz de provocar uma resposta de orientação em outro macho coespecífico.

Em suma, os resultados mostram que as substâncias produzidas pelas GMs certamente estão envolvidas na comunicação sexual destes insetos. Neste trabalho, o papel das secreções das glândulas de Brindley não foi testado em olfatômetro. No entanto, o papel das secreções destas glândulas na comunicação sexual em adultos de *T. brasiliensis* precisa ser avaliado. Apesar de ambos os sexos apresentarem o mesmo perfil de substâncias, nas condições aqui trabalhadas, apenas a secreção das GMs de fêmeas foi capaz de desencadear respostas de atração nos machos. As glândulas metasternais 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 uma 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). Novos bioensaios são necessários para esclarecer o papel funcional desta mistura de odores em *T. brasiliensis*. A natureza multicomponente das secreções de ambos os tipos de 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.

Após a oclusão independente dos orifícios das glândulas metasternais e de Brindley de fêmeas de *T. brasiliensis* observamos uma diminuição na frequência de cópula de 45% e 50%, respectivamente. Quando as duas glândulas foram ocluídas ao mesmo tempo, a porcentagem de cópula caiu para 30%. Crespo & Manrique (2007) e Pontes et al. (2008) demonstraram que a frequência de cópula de *T. infestans* e *R. prolixus* também é diminuída quando os orifícios das glândulas metasternais são ocluídos. No entanto, ao contrário do ocorre com *T. brasiliensis*, a frequência de cópula não foi afetada quando os orifícios das glândulas de Brindley foram ocluídos (Crespo & Manrique 2007, Pontes et al. 2008). Os resultados aqui apresentados mostram a existência de sinais químicos produzidos por ambos os tipos de glândula que aparentemente estariam envolvidos no processo de reconhecimento sexual.

A noção de que os insetos dependem de estímulos químicos para assegurar atividades fundamentais do seu ciclo de vida como acasalamento, alimentação e reprodução 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 produtos naturais provenientes das glândulas exócrinas de *T. brasiliensis* que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos métodos de controle. Para isso, ainda será necessário avaliar a existência de respostas em neurônios receptores destas moléculas de odor na antena de insetos desta espécie. Faz-se necessário determinar como eles respondem aos produtos sintéticos, o seu limiar de estimulação e doses fisiológicas, para permitir uma maior compreensão dos mecanismos olfativos e melhor utilização destes odores no desenho

de métodos de controle e captura. Para isto, e uma vez identificados os limiares de detecção e as relações dose-resposta para cada substância, deverão ser realizados bioensaios com padrões sintéticos para caracterizar o tipo de resposta comportamental associada a cada uma delas. Os feromônios são vitais na comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie, sendo as substâncias modificadoras do comportamento utilizadas com mais frequência no manejo e regulação de populações de insetos-praga. Os resultados aqui apresentados nos permitem propor que após a realização dos experimentos mencionados acima, as substâncias aqui descritas poderão ser utilizadas como iscas químicas para a detecção e captura de machos de *T. brasiliensis*.

#### **6.4 Respostas eletrofisiológicas da antena de machos de *Triatoma brasiliensis* aos odores da glândula metasternal de fêmeas**

O presente trabalho realizou uma identificação detalhada das substâncias produzidas pelas glândulas metasternais de *T. brasiliensis*, aprofundando o conhecimento pré-existente disponível a partir de estudos preliminares (Vitta, 2005). Estes dados permitiram avaliar a existência de respostas antenais em machos desta espécie frente às secreções desta glândula. Desta maneira, foi possível verificar que antenas de machos desta espécie respondem a vários compostos produzidos pelas glândulas metasternais de fêmea.

O estudo de identificação por meio da técnica de CG-EM demonstrou que as glândulas metasternais de *T. brasiliensis* produzem principalmente cetonas, acetais e alcoóis, sendo que os principais constituintes encontrados tanto em machos quanto em fêmeas foram 3-pentanona, 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano, (2S)-metil-1-butanol (4R)-metil-1-heptanol, (1R)-feniletanol,. Alguns dos compostos identificados nas glândulas metasternais de *T. brasiliensis*, tais como a 2-butanona, 3-pentanona, (2S)-butanol, 2,2,4-trietil-5-

metil-1,3-dioxolano, 3-pentanol, 3-metil-2-hexanol, (2*R*)-pentanol e (3*R/S*)-hexanol, podem ser encontrados nas GMs de outras espécies de triatomíneos (Manrique et al. 2006, Pontes et al. 2008). No entanto, alguns compostos como o 4-etil-2-isopropil-5-metil-1,3-dioxolano I e II, o (4*R*)-metil-1-heptanol e o (1*R*)-feniletanol são específicos de *T. brasiliensis*.

Em triatomíneos o uso de infoquímicos é amplo, podendo estar relacionado com o reconhecimento e localização de hospedeiros, sinais de alarme, reconhecimento de possíveis parceiros para o acasalamento e comportamento de agregação (Schofield & Patterson 1977, Núñez 1987, Lorenzo Figueiras et al. 1994, Lorenzo & Lazzari 1996, Taneja & Guerin 1995, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Manrique et al. 2006, Pontes et al. 2008). Após a maturação sexual, os triatomíneos precisam encontrar parceiros para o acasalamento. Até o presente, nenhum trabalho confirmou a existência de sinais químicos específicos capazes de promover a orientação de adultos de triatomíneos durante a procura por parceiro sexual. Porém, os resultados apresentados neste trabalho de tese demonstram que as secreções das glândulas metasternais promovem a orientação de machos de *T. brasiliensis* em diversos contextos. Além disso, os dados apresentados neste capítulo oferecem a primeira evidência de respostas eletrofisiológicas na antena de machos frente à secreção das glândulas metasternais de fêmeas.

A técnica de CG-EAD, utilizando antenas de machos de *T. brasiliensis* como detector biológico, permitiu-nos mostrar que pelo menos cinco substâncias produzidas pelas glândulas metasternais são capazes de promover respostas nos receptores da antena de machos. Baseando-nos no tempo de retenção das substâncias sintéticas e na análise dos compostos previamente identificados, verificamos que as substâncias com atividade na antena foram a 3-pentanona, 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano, (2*S*)-metil-1-butanol, (4*R*)-metil-1-heptanol e o (1*R*)-feniletanol. Experimentos deverão ser realizados

para testar se machos de *T. brasiliensis* apresentam respostas comportamentais em resposta a estas substâncias.

Atualmente, são raros os trabalhos de elucidação estrutural de moléculas de odor em que a técnica de CG-EAD não seja empregada. Grande número de trabalhos tem utilizado esta técnica, sobretudo com lepidópteros (Van der Pers 1981, Van der Pers & Minks, 1997). Millar *et al* (1996) ressaltaram a importância desta técnica na identificação do feromônio sexual de *Anomala nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae). Leal *et al.* (1993) identificaram o feromônio sexual de *Anomala daimiana* (Coleoptera: Scarabaeidae) utilizando também CG-EAD como parte do processo de identificação.

Consideramos que nossos resultados representam um avanço na compreensão dos processos associados com a comunicação química no contexto sexual de *T. brasiliensis*. Particularmente, o presente capítulo coloca em evidência a presença de uma série de produtos na secreção das GMs desta espécie que possui capacidade de promover respostas em neurônios sensoriais da antena de machos. Aprofundar o conhecimento sobre a fisiologia sensorial dos triatomíneos pode contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle baseadas na manipulação de seu comportamento. Resulta de particular interesse e importância contar com ferramentas de detecção, atração e/ou captura de alta sensibilidade.

## **6.5 Comportamento de cópula e associação pós-acasalamento em *Triatoma brasiliensis***

Em particular, verificamos que a idade afeta a motivação dos machos para realizar tentativas de cópula e que o estado nutricional afeta a receptividade da fêmea.

Os resultados aqui apresentados reforçam o conceito de que fatores comportamentais e fisiológicos modulam a duração e a ocorrência de acasalamento em insetos. Além disso, e curiosamente

para triatomíneos, este trabalho mostrou que machos de *T. brasiliensis* reagem à presença de machos competidores guardando a fêmea por um longo intervalo de tempo.

O comportamento sexual de *T. brasiliensis* segue o mesmo modelo geral descrito para outras espécies de triatomíneos (Baldwin et al. 1971, Lima et al. 1986, Rojas et al. 1990, Rojas & Cruz-lópez 1992, Manrique & Lazzari 1994, García-Pérez et al. 1997, Pires et al. 2004). A interação sexual normalmente começa quando machos e fêmeas se encontram ao caminhar. Como já descrito para outras espécies de triatomíneos, os machos desta espécie não mostraram nenhum comportamento evidente de corte. Após posicionar-se dorsolateralmente sobre a fêmea, o macho aproxima a porção posterior do abdômen da fêmea utilizando seu terceiro par de patas, e os parâmeros do macho auxiliam na fixação da sua genitália permitindo a introdução do edeago. A sequência de eventos comportamentais apresentada pelos machos antes, durante e depois da cópula é similar em todas as espécies estudadas (Rojas et al. 1990, Rojas & Cruz-López 1992, Manrique & Lazzari 1994, Pires et al. 2004). Especificamente, alguns comportamentos dos machos descritos por autores prévios tais como posição vigilante, salto, rotação e cópula na posição dorso-lateral também foram observados neste estudo. De maneira similar ao descrito por Brasileiro (1984), a duração da cópula em *T. brasiliensis* apresentou uma média de  $6 \pm 2$  minutos em nossos experimentos. Nota-se que a duração da cópula no gênero *Triatoma* é relativamente curta (Manrique & Lazzari 1994, Vitta 2009, nesta tese), enquanto que em espécies de outros gêneros de Triatominae a duração da cópula pode ser sensivelmente maior, atingindo 50 minutos no caso de *R. prolixus* (Pires et al. 2004, Pontes et al. 2008).

Fêmeas de *T. brasiliensis* exibiram três tipos de comportamento de rejeição em resposta as tentativas de cópula realizadas pelos machos: movimentos abdominais, achatamento corporal e evasão.

Ao contrário do que ocorre em *T. infestans* (Manrique & Lazzari 1994), a estridulação não foi observada como mecanismo de rejeição em resposta as tentativas de cópula realizadas pelos machos de *T. brasiliensis*. Em geral, a literatura mostra pequenas diferenças no comportamento de rejeição executado pelas fêmeas de *R. prolixus* (Pontes et al. 2008), *P. megistus* (Lima et al. 1986, Pires et al. 2004), *T. infestans* (Manrique & Lazzari 1994), *T. mazzottii* (Rojas et al. 1990) e *T. brasiliensis* (este estudo). O achatamento corporal foi o comportamento de rejeição mais frequente para todas as espécies estudadas até o momento, respondendo por 50% das tentativas rejeitadas (Manrique & Lazzari 1994, Pires et al. 2004). Isto pode estar relacionado ao fato de que para alcançar um correto posicionamento da genitália seja necessário que os machos se posicionem lateralmente. Desta forma, ao achatar o corpo contra o substrato, as fêmeas impossibilitariam o posicionamento dos machos. A caracterização dos diferentes tipos de comportamento de rejeição em *T. brasiliensis* foi importante neste trabalho por esclarecer detalhes desconhecidos do seu comportamento sexual. A partir disso, foi possível determinar se as rejeições em resposta às tentativas de cópula dos machos são uma consequência direta do estado nutricional e/ou idade das fêmeas ou se são devidas ao estado nutricional e/ou idade dos machos.

Nossos resultados mostram que a receptividade da fêmea afeta o sucesso de cópula em *T. brasiliensis*. Além disso, demonstramos que a receptividade da fêmea é influenciada pelo seu estado nutricional. Sob nossas condições experimentais, as fêmeas aceitaram copular com maior frequência após a sua alimentação. Quando machos e fêmeas foram alimentados, observou-se uma diminuição gradual no número de rejeições disparadas pelas fêmeas. Deste modo, 11 dias após a alimentação nenhuma rejeição foi observada em T2 (machos e fêmeas alimentados). Curiosamente, a Figura 3 (*inset*) mostra que apesar de não haver rejeições 11 dias

após o primeiro repasto sanguíneo, 100% de cópula já havia sido alcançado com 7 dias. Estes resultados mostram que a alimentação é um fator fundamental para a aceitação de cópula em fêmeas de *T. brasiliensis* e reforçam os dados apresentados por Manrique & Lazzari (1994) para *T. infestans*. Cópulas podem ser eventualmente observadas em fêmeas não alimentadas, porém, nestas condições o sucesso de cópula parece ser prejudicado. Além disso, os resultados apresentados aqui sugerem que a idade da fêmea não afeta sua disposição para acasalar. Porém, experimentos com fêmeas de diferentes idades e estados nutricionais devem ser realizados para testar esta hipótese. Investigações futuras são necessárias para avaliar se a inibição do comportamento de rejeição de fêmeas, induzida pela alimentação, está relacionada com o aumento da atividade dos *corpora allata* (Prat & Davey 1972, Davey 2007).

A alimentação dos machos de *T. brasiliensis* parece não afetar sua motivação para acasalar, visto que o número de tentativas de cópula observado após alimentação foi similar ao dos primeiros dias após a ecdise. É importante ressaltar que os machos tentaram copular a partir do primeiro dia após a muda em todas as séries experimentais. Além disso, a frequência de tentativas de cópula dos machos aumentou aproximadamente no 10º dia após a ecdise em todas as séries. Estes resultados sugerem que a motivação dos machos para acasalar é afetada pela sua idade. A alimentação não induziu um aumento no número de tentativas de cópula, apenas restabeleceu o nível observado em machos jovens não alimentados. Vale ressaltar que machos mantidos em jejum prolongado morreram a partir do 30º dia após a ecdise. Por esta razão, a diminuição na frequência de tentativas de cópula observada nos machos em jejum extremo pode ter sido o resultado de um problema nutricional geral e não um problema especificamente relacionado com a sua motivação para copular. Nossos resultados mostram que a partir do primeiro dia após a muda imaginal, os machos já estão prontos para acasalar,



reforçando dados apresentados para *T. infestans* e *P. megistus* (Regis et al. 1985). Além disso, Freitas et al. (2008) mostraram que o desenvolvimento dos espermatozóides e das glândulas acessórias dos machos de *T. brasiliensis* começa também a partir do primeiro dia após a muda imaginal. Fêmeas de *R. prolixus* são aparentemente incapazes de transportar espermatozóides da *bursa* para a espermateca, a não ser que produtos das glândulas acessórias dos machos sejam transferidos juntamente com o espermatóforo (Davey 1958). Estas substâncias são necessárias pra induzir contrações musculares no ducto da fêmea (Davey 1958). No entanto, faz-se necessário determinar se este fator está presente em machos recém emergidos e avaliar sua capacidade de promover a fertilização dos ovos nessas condições. Adicionalmente, outros sinais hormonais podem modular a motivação dos machos em realizar tentativas copulatórias. É importante aprofundar o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva em triatomíneos, uma vez que pouco se conhece ainda sobre os fatores endócrinos e neurais que podem desencadear alterações da motivação ao longo da vida do indivíduo adulto.

Este trabalho também mostrou que fêmeas alimentadas normalmente não rejeitam as tentativas copulatórias disparadas pelos machos, no entanto, elas rejeitam as tentativas copulatórias realizadas por machos não alimentados. A análise do comportamento de fêmeas alimentadas parece indicar que elas são capazes de reconhecer o estado nutricional dos machos e, como consequência, rejeitar com menor frequência as tentativas de cópula de machos alimentados. O mecanismo pelo qual as fêmeas percebem o estado nutricional dos machos precisa ser estudado.

A atividade sexual destes insetos não termina necessariamente com o primeiro acasalamento. Segundo Baldwin et al. (1971) e Manrique & Lazzari (1995), machos de *R. prolixus* e de *T. infestans* formam agregações ao redor de casais em cópula, provavelmente

aguardando uma nova oportunidade de acasalamento. Este comportamento de agregação estaria relacionado com o favorecimento de poliandria, já que fêmeas de *T. infestans* (Manrique & Lazzari, 1995), de *R. prolixus* (Pontes, comunicação pessoal) e *T. brasiliensis* (neste estudo) copulam com vários machos sequencialmente em um curto intervalo de tempo (1 hora). A implicação do acasalamento múltiplo em Triatominae merece ser estudada, especialmente em relação à diversidade genética da prole. A poliandria é considerada como sendo vantajosa para a fêmea por causar um efeito direto no aumento da fertilidade e na taxa de produção de ovo (Arnqvist & Nilsson, 2000).

Os resultados aqui apresentados mostram que machos de *T. brasiliensis* podem mudar seu comportamento quando outros machos estão presentes. Durante nossas observações, verificamos um componente comportamental diferente executado pelos machos, no qual após a cópula, muitos machos permaneciam associados por um longo período de tempo no dorso da fêmea. Por esta razão, decidimos estudar este parâmetro detalhadamente e testar se a presença de outros machos poderia afetar a duração desta associação. Neste sentido, verificamos que a duração das associações pós-acasalamento foi extremamente variável quando outros machos (rivais) estavam presentes, ao contrário do que ocorre quando não há machos em torno de um casal em cópula. Estes resultados sugerem que as associações podem estar relacionadas com a guarda por parceiro em *T. brasiliensis*, provavelmente com o propósito de evitar que outros machos copulem com a fêmea recém acasalada (Alcock 1994). Machos de outras espécies de hemípteros também guardam suas parceiras após o acasalamento, aparentemente com a finalidade de aumentar a chance de fertilizar um maior número de ovos (Carroll 1991, Schöfl & Taborsky 2002). Faz-se necessário avaliar o significado deste comportamento em *T. brasiliensis* e examinar os custos e benefícios desta associação.

## CONCLUSÕES

---

## 7 Conclusões

- O padrão temporal de saídas do abrigo em adultos de ambos os sexos de *T. brasiliensis* variou ao longo do período estudado. Machos e fêmeas saem mais dos abrigos durante a primeira hora da fase escura.
- Ao sair do abrigo, machos e fêmeas aumentam sua atividade locomotora em torno dele, também na primeira hora da fase escura.
- O número de fêmeas que saem do abrigo na ausência de estímulos olfativos é maior que o de machos.
- A atividade locomotora basal de fêmeas em torno dos abrigos também é maior que a dos machos.
- Quando machos de *T. brasiliensis* estão no interior do abrigo, o odor emitido por fêmeas é capaz de provocar um aumento significativo do número de machos que saem dele.
- Uma vez fora do abrigo, a presença de odor de fêmea provoca um aumento na atividade locomotora dos machos e também aumenta o número de tentativas de cópula entre eles.
- O número de fêmeas que saem do abrigo, assim como sua atividade locomotora, não é alterado na presença de odor de macho.
- O início da atividade de voo parece ser maior durante as primeiras horas da fase escura tanto em machos quanto em fêmeas.
- O início da atividade de voo de machos de *T. brasiliensis* pode ser desencadeado por corrente de ar associadas com odor de fêmea e a frequência deste comportamento é maior durante as primeiras horas da fase escura.

- O odor de fêmea associado a correntes de ar promove respostas orientadas de início de voo por parte dos machos.
- Machos são significativamente atraídos por correntes de ar associadas com odor de fêmea e de macho, quando testados em olfatômetros.
- Os compostos produzidos pelas glândulas metasternais de fêmeas são responsáveis pela atração dos machos no olfatômetro.
- A origem dos sinais que provocaram a atração de machos por machos no olfatômetro é desconhecida.
- O produto das glândulas metasternais de fêmeas participam da ocorrência de cópula nesta espécie.
- O produto das glândulas de Brindley de fêmeas também parecem contribuir para a ocorrência de cópula nesta espécie.
- As glândulas metasternais de *T. brasiliensis* são responsáveis pela síntese de substâncias voláteis. Estas glândulas produzem basicamente cetonas, dioxolanos e álcoois, sendo que os principais constituintes encontrados tanto em machos quanto em fêmeas foram a 3-pentanona, 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano, (2S)-metil-1-butanol, (4R)-metil-1-heptanol e o (1R)-feniletanol.
- A técnica de CG-EAD, utilizando antenas de machos de *T. brasiliensis* como detector biológico, mostrou que cinco substâncias produzidas pelas glândulas metasternais são capazes de promover respostas, a saber: 3-pentanona, (4R)-metil-1-heptanol, (2S)-metil-1-butanol, (1R)-feniletanol, 2,2,4-trietil-5-metil-1,3-dioxolano.

- Fêmeas de *T. brasiliensis* exibem três tipos de comportamento de rejeição em resposta as tentativas de cópulas realizadas pelos machos: movimentos abdominais, achatamento corporal e evasão.
- A idade afeta a motivação dos machos para realizar tentativas de cópula e o estado nutricional afeta a receptividade das fêmeas.
- Machos de *T. brasiliensis* reagem à presença de outros machos guardando a fêmea por longos intervalos de tempo.
- A análise do comportamento de fêmeas alimentadas sugere que são capazes de reconhecer o estado nutricional dos machos e aceitar com maior frequência as tentativas de cópula de machos alimentados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

---

## 8 Referências Bibliográficas

ALENCAR JE (1987). História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará, Fortaleza. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, pp. 341

ALCOCK J (1994). Post insemination association between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Ann Re. Entomol* 39:1-21.

AMPLEFORD EJ, STEEL CGH (1982). Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J Comp Physiol [A]* 147:281-286.

ARNQVIST G, NILSSON T (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behavior* 60: 145-164.

BALDWIN WF, KNIGHT AG, LYNN KR (1971). A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can Ent* 103:18-22.

BARRETT FM, MILLEN BF, LAI-FOOK J (1979). The Brindley's glands of *Rhodnius prolixus*. I. Structure of the mature gland. *Can J Zool* 57: 1109-1119.

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

BARROZO RB, LAZZARI CR (2004a). The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses* 29:319-329.

BARROZO RB, LAZZARI CR (2004b). Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses* 29:833-841.



BARROZO RB, SCHILMAN PE, MINOLI S, LAZZARI CR (2004). Daily rhythms in disease-vector insects. *Biological Rhythm Research* 35: 79-92.

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

BATSCHLET E (1965). Statistical methods for the analysis of problems in animal orientation and certain biological rhythms. The American Institute of Biological Sciences, 371 pp.

BAKER TC, CARDÉ RT (1979b). Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha molesta*. *J Insect Physiol* 25:263-279.

BLUM MS (1996). Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Ann. Rev Entomol* 41: 353-74.

BENTO JM (2001). Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-pragas, cap. 16. *In: Vilela E.F. & Della Lucia T.M.C. 2001. Feromônios de Insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas, 2º edição.*

BERNARD J (1974). Étude Électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un Hémiptère: *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral, University of Rennes, Francia.

BIRCH MC, HAYNES KF (1982). Insect pheromones. The institute of Biology's. *Studies in biology* 147: pp.60.

BORDEN JH (1990). Use of semiochemicals to manage coniferous tree pests in western Canada. In: Sexual behaviors of the green capsid bug. PhD Thesis (Groot AT 2000).

BODIN A, BARROZO RB, COUTON L, LAZZARI CR (2008). Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 54:1343-1348.

BRASILEIRO VLF (1982). Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera - Reduviidae). I- Influência da cópula e da longevidade. *Revista Brasileira de Biologia* 42:1-13.

BRASILEIRO VLF (1984). Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera - Reduviidae). II- Influência da cópula e da nutrição. *Revista Brasileira de Entomologia* 28: 441-449.

BRINDLEY MD (1930). On the metasternal scents-glands of certain Heteroptera. *Trans. Ent. Soc. Lond.* 78:199-208.

BUTENANDT A, BECKMANN R, STAMM D, HECKER E (1959). Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitutionsermittlung. *Zeitschrift für Naturforschung* 14b: 283-284.

CARBAJAL DE LA FUENTE AL, MINOLI SA, LOPES CM, NOIREAU F, LAZZARI CR, LORENZO MG (2007). Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica* 101: 115-119.

CARCAVALLO RU, GALÍNDEZ GIRÓN I, JUBERG J, LENT H (1999). Atlas of Chagas` s disease vectors in the Americas Vol. III 746-1217.

CARROLL SP (1991). The adaptive significance of mate guarding in the soap-berry bug, *Jadera haematoloma* (Hemiptera: Rhopalidae), *Journal of Insect Behaviour* 4: 509-30.

CEBALLOS LA, VAZQUEZ-PROKOPEC GM, CECERE MC, MARCET PL, GURTNER RE (2005). Feeding rates nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Tropica* 95:149-59.

CRESPO JG, MANRIQUE G (2007). Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. *J. Insect Physiol.* 53(7):708-14.

CIVETTA A (1999). Direct visualization of sperm competition and sperm storage in *Drosophila*. *Current Biology* 9: 841-844.

CRUZ LÓPEZ L, MORGAN ED, ONDARZA RN (1995). Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. En.* 9:403-406.

CRUZ-LÓPEZ L, MALO EA, ROJAS JC (1993). Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88:535-539.

CONSTANTINO C (1984). Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma phyllossoma*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *J Interdisciplinary cycle research* 15:203-212.

CHAPMAN RF (1998). The insects: structure and function. 4<sup>th</sup> edition Cambridge University Press, UK. 770 pp.

CARDÉ RT, ELKINTON JS (1984). Field trapping with attractants: methods and interpretation, p 111-129. In: Techniques in pheromone research (eds. Hummel HE, Miller TA). Springer-Verlag, New York 464 pp.

CARDÉ RT, BELL WJ (1995). Chemical ecology of insects 2. Chapman & Hall, New York, pp 443.

CARDÉ RT, MINKS AK (1997). Insect pheromone research: new directions. Chapman & Hall, New York, pp 684.

CARLSON DA, BEROZA M (1973). Field evaluations of (Z)-9-tricosene, a sex pheromone of the housefly. *Environ Entomol* 2:255-259.

CHAPMAN RF (1998). The insects: structure and function. 4<sup>th</sup> edition. Cambridge University Press, UK, pp. 770.

CROSS JH, BYLER RC, SILVERSTEIN RM, GREENBLATT RE, GORMAN JE, BURKHOLDER WE (1977). Sex pheromone components and calling behavior of the female dermestid beetle, *Trogoderma variabile* Ballion (Coleoptera: Dermestidae). *J. Chem. Ecol.* 3:115-125.

CRESPO J MANRIQUE G (2007). Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.03.014>.

CRUZ-LÓPEZ L, MALO EA, ROJAS, JC, MORGAN ED (2001). Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med. Vet. Entomol.* 15:351-357.

DAVEY KG (1958). The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus* Stal. *Journal of Experimental Biology* 35: 694-701.

DAVEY, K.G. 1965. Copulation and egg-production in *Rhodnius prolixus*: the role of the spermathecae. *J. Exp. Biology* 42: 373-378.

DAVEY, K.G. 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.* 53: 208-215.

DE BRITO SANCHÉZ MG, MANRIQUE G, LAZZARI CR (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) II. Electrophysiological correlates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90: 649-651.

DIAS JC, MACHADO EM, FERNANDES AL, VINHAES MC (2000). Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 16: 13-34.

DIEHL P, VLIMANT A, GUERENSTEIN P, GUERIN PM (2003). Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Structure Development* 31: 271-285.

DURAND D, GREENWOOD JA (1958). Modification of the Rayleigh test for uniformity in analysis of two-dimensional orientation data. *J. Geology* 66: 229-238.

DUMSER JB, DAVEY GD (1974). Endocrinological and other factors influencing testis development in *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.* 52: 1011-1022.

ESPÍNOLA HN (1966). Nota sobre as diferenças sexuais em formas imaturas de Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia* 26(3): 263-267.

EBERHARD WG (1996). Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp. 501.

FISHER NI (1993). Statistical analysis of circular data. Cambridge University Press, Cambridge, 295 pp.

FLORES GB, LAZZARI CR (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: Orientation toward thermal sources. *J. Insect Physiol.* 42: 433-440.

FONTAN A, AUDINO PG, MARTINEZ A, ALZOGARAY RA, ZERBA EN, CAMPOS F, CORK A (2002). Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease: chemical analysis and behavioral bioassay. *J. Med. Entomol.* 39:191-197.

FRIEND WG & SMITH JJB (1985). Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J. Insect. Physiol.* 17:233-243.

GAMES DE, SCHOFIELD CJ, STADDON BW (1974). The secretion from Brindley's scent gland in Triatominae. *Ann. Soc. Ent. Am.* 67: 820-826.

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

GALVÃO C. & ANGULO V.M. (2006). *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1241:61-68.

GARCÍA-PÉREZ J, BLANCO-PINON A, NAVARRO-FERNANDEZ E (1997). Comportamiento sexual de *Triatoma gerstaeckeri* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Zoologica Mexicana*, 70: 55-63.

GROOT AT (2000). Sexual behaviour of the green capsid bug. PhD thesis, University of Wageningen: 11-150.

GUARNERI AA, PEREIRA MH, DIOTAIUTI L (2000). Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 37:373-379.

GUERENSTEIN PG, LAZZARI CR (2008). Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Tropica* doi: 10.1016/j.actatropica.2008.09.019.

GUERENSTEIN PG, GUERIN PM (2004). A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Entomol. Exp. Appl.* 111:151-155.

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

GUERENSTEIN PG (1999). Sensory and behavioural responses of *Triatoma infestans* to host and conspecific odours. PhD Thesis. Université de Neuchatel, Switzerland.

GUERENSTEIN PG, LORENZO MG, NÚÑEZ JA, LAZZARI CR (1995). Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia*, 51(8):834-837.

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

GREENWOOD JA, DURAND D (1955). The distribution of length and components of the sum of n random unit vectors. *Annals of Mathematical Statistics* 26:233-246.

GUREVITZ JM, CEBALLOS LA, KITRON U, GÜRTLER RE (2006). Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. *J Med Entomol* 43: 143-150.

HAWKINS WA, RUST KM (1977). Factors influencing male sexual response in the American cockroach *Periplaneta americana*, *Journal of Chemical Ecology* 3:85-99.

HOMBERG U, CHRISTENSEN TA, HILDEBRAND JG (1989). Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 477-501.

JUÁREZ P, BRENNER RR (1981). Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans* (vinchuca). V. Emisión de ácidos grasos volátiles. *Acta Fisiológica Latino-Americana*, 31: 113-117.

KÄLIN M, BARRETT FM (1975). Observations on the anatomy, hystology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68:126-134.

KALRSON P & LUSCHER M (1959). " Pheromones" a new term for a class of biologically active sustances. *Nature*, 183: 155-156.

KAISSILING KE, THORSON J (1980). Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization. In *Receptors for Neurotransmitters, Hormones in Insects* (ed. Satelle DB, Hall LM, Hildebrand JG), pp 261-282. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

KOVÁTS E (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, pp. 229-247, *in* J. C. Giddings and R. A. Keller (eds.). *Advances in Chromatography Vol. 1*. Edward Arnold Ltd., London.

KRISHNAN B, DRYER SE, HARDIN PE (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400: 375-378.

LAZZARI CR (1991). Temperature preference in *Triatoma infestans*. *Bulletin of Entomological Research* 81:273-276.

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



LAZZARI CR, MINOLI AS, BARROZO RB (2004). Chemical ecology of insect vectors: the neglected temporal dimension. *Trends in Parasitology* 20, 506-507.

LEAL WS, SAWADA M, HASEGWA M (1993). The Scarab beetle *Anomala daimiana* utilizes a blend of two other *Anomala spp.* sex pheromones. *Naturwissenschaften* 80:181-183.

LAVOIE-DORNIK J, MCNEIL JN (1987). Sensilla of the antennal flagellum in *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Ins. Morphol. Embryol.* 16: 153-167.

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

LEHANE MJ, SCHOFIELD CJ (1976). Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Transac. Royal Society Trop. Medic. Hyg.* 70:520-526.

LEHANE MJ, SCHOFIELD CJ (1981). Field experiments on dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Transac. Royal. Society Trop. Medic. Hyg.* 75:399-404.

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

LEHANE MJ, MCEWEN PK, WHITAKER CJ, SCHOFIELD CJ (1992). The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* 52:27-38.

LORENZO FIGUEIRAS AN, LAZZARI C (1998). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiol Entomol* 23: 33-37.

LORENZO FIGUEIRAS AN, LAZZARI C (2000). Temporal change of the aggregation response in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 889-892.

LORENZO FIGUEIRAS NA, LAZZARI C (2002a). Aggregation behaviour and interspecific responses in *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 569-571.

LORENZO FIGUEIRAS NA, LAZZARI C (2002b). Aggregation behaviour and interespecific responses in three species of Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 133-137.

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

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

LORENZO MG, LAZZARI CR (1999). Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Tropica* 72: 241-249.

LORENZO FIGUEIRAS AN, KENIGSTEN A, LAZZARI CR (1994). Aggregation in haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J. Insect Physiol.* 40: 312-316.

MALO EA, RAMÍREZ-ROVELO A, CRUZ-LÓPEZ L, ROJAS JC (1993). Life cycle and influence of age and feeding on the first mating of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88: 203-206.

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

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

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

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

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

MILLAR JG, KNUDSON AE, McELFRESH JS, GRIES R, GRIES G, DAVIS JH (1996). Sex attractant pheromone of the pecan nut casebearer (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioorg. Medic. Chem.* 4:331-339.

MILLER JR & ROELOFS WL (1980). Individual variation in pheromone sexual component ratios in two populations of the redbanded leafroller moth, *Argyrotaenia velutinana*. *Environ Entomol.* 9:359-363.

MINKS AK, VAN DEVENTER P (1992). Practical applications: the European scene, Pheromones and behaviour modifying chemicals: 51:9-18.

MINOLI SA, LAZZARI CR (2003). Chronobiological basis of thermopreference in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* 49:927-932.

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

MOTA TRP (2006). Sinais de agregação em *Panstrongylus megistus* e a interação desta espécie com *Triatoma infestans* no interior de abrigos. Tese de Mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte – MG, Brasil.

MORA IRM (1991). Resposta da broca do café, *Hypothenemus hampei*, a estímulos visuais e semioquímicos. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa, p. 44.

NATION JL (2002). *Insect Physiology and Biochemistry*. University of Florida, CRC Press, pp. 485.

NOIREAU F, DUJARDIN JP (2001). Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:385-389.

NOIREAU F, FLORES R, GUTIERREZ T, ABAD-FRANCH F, FLORES E, VARGAS F (2000). Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:23-27.

NORDLUND DA & LEWIS WJ (1976). Terminology of Chemical-releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.* 2:211-220.

NORDLUND DA (1984). Semiochemicals: A review of the terminology, p.13-28. In: Nordlund, D.A.; L.J.Richard & W.J.Lewis (eds), *Semiochemicals and their role in pest control*. Jhon Wiley & Sons, New York.306p.

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

NÚÑEZ JA (1987). Behaviour of Triatominae bugs. In: Chagas` disease Vectors, vol II Anatomic and Physiological aspects (eds. Brenner RR, Stoka AM), pp 1-30, CRC Press.

ONDARZA RN, GUTIERREZ-MARTINEZ A, MALO EA (1987). Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Econom. Entomol.* 79:688-692.

OTRONEN M (1998). Male asymmetry and postcopulatory sexual selection in the fly *Dryomyza anilis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42: 185-191.

PAGE TL & KOELLING E (2003). Circadian rhythms in olfactory response in the antennae controlled by the optic lobe in the cockroach. *Journal of Insect Physiology* 49:697-707.

PAWLISZYN J (1997). Solid Phase Micro Extraction. Theory and Practice. Wiley-VHC, New York, pp. 247.

PARKER GA (1970a). Sperm Competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45: 525-567.

PARKER GA (1970b). The reproductive behaviours and the nature of sexual selection in *Scatophaga stercoraria* L. (Diptera: Scatophagidae) IV. Epigamic recognition and competition between males for the possession of females. *Behaviour* 37: 8-139.

PARKER GA (1974). Courtship persistence and female-guarding as male time investment strategies. *Behaviour* 48: 157-184.

PARKER GA & SIMMONS LW (1994). Evolution of phenotypic optima and copula duration in dungflies. *Nature*, 370: 53-56.

PARKER GA & SIMMONS LW (2000). Optimal copula duration in yellow dung flies: Ejaculatory duct dimensions and size-dependent sperm displacement. *Evolution*, 54: 924-935.

PATTENDEN G & STADDON BW (1972). Identification of iso-Butyric acid in secretion from Brindley's scent glands in *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). *Ann Entomol Soc Am*, 65(5): 1240-1241.

PIÑERO JC, GALIZIA CG, DORN S (2007). Synergistic behavioral responses of female oriental fruit moths (Lepidoptera: Tortricidae) to synthetic host plant-derived mixtures are mirrored by odor-evoked calcium activity in their antennal lobes. *J. Insect Physiol.* 54: 333-343.

PIRES HHR, LORENZO MG, DIOTAIUTI L, LAZZARI CR AND LORENZO FIGUEIRAS AN (2002). Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. *Acta Tropica* 81 (1):47-52.

PIRES HHR, LORENZO MG, LAZZARI CR, DIOTAIUTI L & MANRIQUE G (2004). The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae): an experimental study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol 99(3): 295-300.

POINAR JG (2005). *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatide Vector Association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 72-81.

PRATT GE, DAVEY KG (1972). The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal). III. The effect of mating. *J. Exp. Bio.* 56: 223-237.

PONTES GB, BOHMAN B, UNELIUS CR, LORENZO MG (2008). Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Chem. Ecol.* 34(4):450-7.

RAINA AK, KINGAN TG & MATTO AK (1992). Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science*, 244: 796-798.

RAINA AK, KINGAN TG & GIEBULTOWICZ JM (1994). Mating-induced loss of sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantria dispar*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 25: 317-327.

RÍOS CANDELARIA E (1999). Análisi 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, Chiapas.

REGIS L, GOMES YM, FURTADO AF (1985). Factors influencing male accessory gland activity and first mating in *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Inst Sci Applic*, 6: 579-583.

REISENMAN CE, LAZZARI CR, GIURFA M (1998). Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol. [A]* 183:533-541.

REISENMAN CE, LORENZO FIGUEIRAS AN, GIURFA M, LAZZARI CR (2000). Interaction of visual and olfactory cues in the aggregation behaviour of the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol. [A]* 183:533-541.

REISENMAN C, INSAUSTI T, LAZZARI C (2002). Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Exp. Biol.* 205:201-210.

ROJAS JC, RIOS-CANDELARIA E, CRUZ LÓPEZ L, SANTIESTEBAN A, BOND-COMPEAN JG, BRINDIS Y, MALO, EA (2002). A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compound of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 39:256-265.

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

ROJAS JC, MALO EA, GUTIERREZ-MARTINEZ A, ONDARZA RA (1990). Mating behaviour of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Annals of the Entomological Society of America* 83: 598-602.

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

RÍOS-CANDELARIA E (1999). Análisis químico y conductual de los compuestos volátiles emitidos por *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), vector de la enfermedad de Chagas. PhD dissertation. Universidad Autónoma de Chiapas, México.

ROELOFS WL, CARDÉ RT (1974). Sex pheromone in the reproductive isolation of lepidopterous species. In: *Pheromone*, ed. MC Birch, pp96-114, North-Holland, Amsterdam.

RODRÍGUEZ D, RABINOVICH JE (1980). The effect of density on some population parameters of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 17:165-171.

SABELIS MW, SCHIPPERS (1984). Variable wind directions and anemotactic strategies of searching for an odour plume. *Oecologia.* 63: 225-228.



SAUNDERS DS, STEEL CGH, VAFOPOULOU X, LEWIS RD (2002). *Insects Clocks*, 3rd ed. Elsevier Science, Amsterdam.

SCARAFFIA PY, REMEDI MS, MALDONADO C, AOKI A, GEREZ DE BURGOS NM (1997). Enzymatic and ultrastructural changes in thoracic muscles of triatomine insects during the last stages of metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 116A(2):173-179.

SANTOS-MALLET JR & SOUZA W (1990). Histological and ultrastructural aspects of the Brindley's glands of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85(2): 141-152.

SCHNEIDER D (1964). Insect antennae. *Ann. Rev. Entomol.* 9:103-122.

SCHOFL G, TABORSKY M (2002). Prolonged tandem formation in firebugs (*Pyrrhocoris apterus*) serves mate guarding. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52:426-433.

SCHOFIELD CJ, MATTHEWS JNS (1985). Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by *Triatoma infestans*. *J. Trop. Med. Hyg.* 88: 211-222.

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

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

SCHOFIELD CJ (1994). *Triatominae: Biologia y control*. Eurocommunica Publications, West Sussex, pp. 80.

SCHWEIGMANN N, VALLVE S, MUSCIO O, GHILLINI M, ALBERTI A, WISNIVESKY-COLLI C (1988). Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 2(4):401-404

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

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

SILVEIRA AC, FEITOSA VR & BORGES R (1984). Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Rev Brasileira Malariologia e Doenças Trop*, 36 : 15-312.

SILVEIRA AC, VINHAES M (1998). Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31:15-60.

SIMMONS LW (2001). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, pp. 433.

SOARES RPP (1997). Aspectos biológicos e morfológicos relacionados à atividade de voo das principais espécies vetoras da doença de Chagas no Brasil. Tese, UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 94pp.

SJOGREN RD, RYCKMAN RE (1966). 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.* 3(1):81-92.

STADDON BW (1979). The scent glands of Heteroptera. *Advances in Insect Physiology*, 14: 131-157.

STEINBRECHT RA, SCHNEIDER D (1980). Pheromone communication in Moths sensory physiology and behavior. In: *Insect Biology in the future* (eds. Locke M, Smith DS). Academic Press, New York.

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

TANEJA J & GUERIN PM (1995). Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. *J Comp Physiol A* 176: 455-464.

TANEJA J & GUERIN PM (1997). Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *J Comp Physiol A*, 181: 21-34.

THORNHILL R & ALCOCK J (1983). The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge, USA, pp. 547.

THORNHILL R (1984). Alternative female choice tactics in the scorpionfly *Hylobittacus apicalis* (Mecoptera) and their implications. *Am Zool*, 24: 367-383.

THIERRY J, HEGER, PATRICK M, GUERIN, WERNER EUGSTER (2006). Microclimatic factors influencing refugium suitability for *Rhodnius prolixus*. *Physiol. Entomol.* 31:248-256.

TRISTAM WD (2003). Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste. Cambridge University Press, New York, ISBN: 0521485266, pp. 410.

TONN RJ, ESPÍNOLA H, MORA E, JIMÉNEZ JE (1978). Trampa de luz negra como método de captura nocturna de Triatomíneos en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* 18:25-30.

VAN DER PERS JNC (1980). Comparison of electroantennogram response spectra to plant volatiles in seven species of *Yponomeuta* and in the tortricid *adoxophyes orana*. *Ent. Exp. Appl.* 30: 181-192.

VAN DER PERS JNC, MINKS AK (1997). Measuring pheromone dispersion in the field with the single sensillum recording technique, p 359-371. In: *Insect Pheromone Research: New directions* (eds. Cardé RT, Minks AK) Chapman & Hall, New York, 684 p.

VAZQUEZ-PROKOPEC GM, CEBALLOS LA, KITRON U, GURTLER RE (2004). Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. *J. Med. Entomol.* 41(4):614-621.

VELASQUEZ ANTICH A (1965). 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). *Archivos Venezolanos de Medicina e Parasitología Medica*, 5, 329-344.

VELASQUEZ ANTICH A (1968). Atracción por el olor en ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus* (Stal). *Revista Internacional de Medicina Tropical*, 10: 242-246.

VILELA EF & DELLA LUCIA TMC (2001). Feromonios de Insetos. Biología, química e emprego no manejo de pragas. 2º edição.

VINHAES MC, DIAS JCP (2000). Chagas disease in Brazil. *Cad Saúde Pública* 16: 7-12.

VITTA ACR, FIGUEIRAS NA, LAZZARI CR, DIOTAIUTI L, LORENZO MG (2002). Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97:865-867.

VITTA ACR (2005). Caracterização morfológica das glândulas de Brindley e metasternais, identificação química das suas secreções e comportamento sexual de *Triatoma brasiliensis*. Tese de Mestrado, Viçosa – MG, Brasil

VITTA ACR, MOTA TRP, LAZZARI CR, DIOTAIUTI L, LORENZO MG (2007). The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). *Acta Trop.* 101:146-152.

VITTA ACR & LORENZO MG (2009). Copulation and mate guarding behaviour in *Triatoma brasiliensis*. *In press* (Journal of Medical Entomology).

VELASQUEZ ANTICH A (1968). Atracción por el olor en ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus* (Stal). *Revista Internacional de Medicina Tropical* 10:242-246.

VILELA EF, MAFRA-NETO A (2001). Registro de feromônios comerciais e legislação. cap. 19. *In: Vilela E.F. & Della Lucia T.M.C. 2001. Feromônios de Insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2º edição.*

WANG Q, MILLAR GJ (2000). Mating behavior and evidence for male-produced sex pheromone in *Leptoglossus clypealis* (Heteroptera, Coreidae). *Behavior* 4: 972-976.

WAAGE JK (1979). Adaptive significance of postcopulatory guarding of mates and nonmates by males *Calopteryx maculata* (Odonata). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 6: 147-154.

WARD JP (1981). A comparison of the behavioural responses of the haematophagous bug *Triatoma infestans* to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n- and acid isobutyric). *Physiol. Entomol.* 6: 325-329.

WARD JP, FINLAYSON LH (1982). Behavioural responses of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to visual stimuli. *Bull. Entomol. Res.* 72:357-366.

WEISS MR (2006). Defecation behaviour and ecology of insects. *Annu Rev Entomol* 51:635-661.

WERTHEIM B (2005). Evolutionary ecology of communication signals that induce aggregative behaviour. *Oikos* 109: 117-124.

WERTHEIM B, ERIK-JAN AVB, DICKE M, VET LEM (2005). Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary and ecological perspective. *Annu Rev Entomol* 50: 321-346.

WEST RJ, BOWERS WW (1994). Factors affecting calling behavior by *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lepidoptera: Geometridae) under field conditions. *Physiol. Chem. Ecol.* 23:122-129.

WIGGLESWORTH VB (1933). The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera) with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *Q. J. Microsc. Sci.*, 76: 269-319.

WIGGLESWORTH VB, GILLET JD (1934). The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. *J. Exp. Biol.* 11:120-138.

WILLIAMS NG, SCHOFIELD CJ (1985). The role of temperature in flight initiation of triatomine bugs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:282-285.

WISNIVESKY-COLLI C, GURTNER RE, SOLARZ ND, SCHWEIGMANN N, PIETROKOVSKY SM, ALBERTI A, FLO J (1993). Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88:27-32.

WHO (2005). World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 96 pp.

ZAR JH (1984). Biostatistical Analysis, Prentice-Hall, New Jersey. p.718.

Zeledón R & Rabinovich JE (1981). Chaga's disease and ecological appraisal with special emphasis on its insects vectors. *A. Rev. Ent.* 26, 101-133.

ZHUKOVSKAYA MI (1995). Circadian rhythm of sex pheromone perception in the male American *Periplaneta americana* L. *Journal of Insect Physiology* 41:941-946.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)