

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Atividade locomotora, uso de abrigos e predação em *Rhodnius prolixus*:
alterações induzidas pela infecção por tripanosomatídeos**

por

Newmar Pinto Marlière

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2015**

DISSERTAÇÃO

MDIP-CPqRR

N.P. MARLIÈRE

2015

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Atividade locomotora, uso de abrigos e predação em *Rhodnius prolixus*:
alterações induzidas pela infecção por tripanosomatídeos**

por

Newmar Pinto Marlière

**Dissertação apresentada com vistas
à obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias**

Orientação: Alessandra Aparecida Guarneri

Coorientação: Marcelo Gustavo Lorenzo

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2015**

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

M348a Marlière, Newmar Pinto.
2015

Atividade locomotora, uso de abrigos e predação em *Rhodnius prolixus*: alterações induzidas pela infecção por tripanosomatídeos / Newmar Pinto Marlière. – Belo Horizonte, 2015.

XIV, 50 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 56 - 65

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

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. *Trypanosoma rangeli*/parasitologia I. Título. II. Guarneri, Alessandra Aparecida (Orientação). III. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Atividade locomotora, uso de abrigos e predação em *Rhodnius prolixus*:
alterações induzidas pela infecção por tripanosomatídeos**

por

Newmar Pinto Marlière

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alessandra Aparecida Guarneri (Presidente)

Prof. Dr. Eraldo Rodrigues de Lima

Prof. Dr. Fernando Abad-Franch

Suplentes: Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2015

“Eu temo pelo cansaço dos bons.”

Papa Pio XII

À Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus passos e se fazer presente em cada segundo na minha vida.

À Dra. Alessandra Guarneri, pela orientação, confiança, paciência e pelo entusiasmo científico que muito me ensinou desde a iniciação científica.

Ao Dr. Marcelo Lorenzo, pela coorientação e fundamental participação nesta dissertação, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Ao Dr. José Manuel, pela disponibilidade e contribuição, mas principalmente pela amizade.

À Dr. Liléia pelo exemplo e carinho.

Aos membros da banca avaliadora por aceitarem o convite e pelas contribuições propostas.

À Lu, meu amor, meu porto seguro. Pelo apoio incondicional e por ter me acompanhado em cada etapa na realização deste sonho, com seu lindo sorriso, com seus abraços e imensuráveis conselhos. Aos seus familiares representados pela Dona Wilma, pelo apoio, carinho e confiança.

À Ju e a Robertinha, amigas com as quais compartilhei momentos especialíssimos, pelo carinho e consideração.

À Raissa, companheira de mestrado, com quem compartilhei angustias e dificuldades e que apesar de ter aproveitado da minha inteligência, foi indispensável em cada momento ao longo destes dois anos.

À Marinely e ao Jorge, pela amizade que em pouco tempo se formou, mas que muito representa.

À Thessinha, pelo convívio durante todos estes anos, pelos conselhos e por sempre ter uma palavra de incentivo nos momentos mais difíceis.

À Raquelita, por ser sempre uma figura alegre no laboratório e trazer leveza ao ambiente de trabalho.

Ao Gui, pela longa e sólida amizade, pelas risadas e constante apoio.

À Aline e ao Iago, amigos que fazem de cada minuto no laboratório um momento muito mais alegre e especial.

À Silvinha, primeira orientadora e quem me abriu as portas para a carreira científica.

Ao Ade, primeiro professor, que muito me ensinou na manipulação das galinhas e dos triatomíneos.

À Fellet e ao Thiago, amigos, confidentes, com os quais muito aprendi e pude compartilhar durante toda essa caminhada.

À Grasi, pela preocupação, por todos os conselhos e pela companhia infalível até fechar o laboratório e na labuta dos finais de semana.

Ao João Paulo e ao João Victor, amigos de fé, meus irmãos e camaradas!!!

Aos amigos do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, pela amizade, momentos felizes e momentos difíceis. Pelo crescimento profissional, mas principalmente pelo crescimento pessoal, que a sua maneira cada um me proporcionou. Pelos cafezinhos, pelas brincadeiras, e por todas as conversas e discussões. À Bárbara, Carina, Carlota, Cinthia, Eduardo, Emerson, Flávia, Nathália, Rita, Rafaela, enfim a todos os “chatomíneos” e “chatemanetos”.

Aos meus pais (Newton e Márcia), pelo exemplo de caráter e de vida, por todo o esforço durante minha formação de homem e profissional. Por sempre acreditarem nos meus sonhos e não medirem esforços para torná-los realidades. Mas principalmente por todo amor que sentem e demonstram por mim.

À minha irmã Nina (Marina), por me amar, dar força e por não duvidar do meu trabalho, capacidade e pelos conselhos.

Aos meus familiares, representados pelos meus avós José e Marli, exemplos de fé e perseverança, por entenderem minhas ausências e confiarem mim.

Agradeço as Instituições que apoiaram diretamente esse trabalho:

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/MG

Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais.

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Ciência e Tecnologia.

INCT-EM Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Triatomíneos	26
3.2 Parasitos	26
3.3 Infecção de <i>Rhodnius prolixus</i>	26
3.4 Atividade locomotora	27
3.5 Uso de abrigos	28
3.6 Predação	30
3.7 Infecção Oral	31
3.8 Análise dos resultados	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Atividade locomotora	33
5.2 Uso de abrigos	38
5.3 Predação	43
5.4 Infecção Oral	46
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do actômetro. _____ 28
- Figura 2:** Desenho experimental para o estudo dos padrões de uso dos abrigos. _30
- Figura 3:** Desenho experimental para a avaliação das taxas de predação. _____ 31
- Figura 4:** Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre o perfil de atividade locomotora de ninfas de *Rhodnius prolixus*. _____ 34
- Figura 5:** Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre o número total de movimentos de ninfas de *Rhodnius prolixus*. _____ 34
- Figura 6:** Efeito da infecção por *T. cruzi* na porcentagem de insetos ativos. _____ 35
- Figura 7:** Efeito da infecção por *T. cruzi* no número de movimentos apresentados por insetos ativos. _____ 35
- Figura 8:** Efeito da infecção por *T. rangeli* sobre o perfil de atividade locomotora de ninfas de *Rhodnius prolixus*. _____ 36
- Figura 9:** Efeito da infecção por *T. rangeli* sobre a atividade de ninfas de *Rhodnius prolixus*. _____ 37
- Figura 10:** Efeito da infecção por *T. rangeli* na porcentagem de ninfas ativas. ____ 37
- Figura 11:** Efeito da infecção por *T. rangeli* no número de movimentos apresentados pelas ninfas ativas. _____ 38
- Figura 12:** Dinâmica de entradas e saídas de abrigos de ninfas de *Rhodnius prolixus* infectadas ou não por *T. rangeli*. _____ 39
- Figura 13:** Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* que entram nos abrigos após um período de três dias de aclimação. ____ 40

- Figura 14:** Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre a dinâmica de entradas e saídas de abrigos de ninfas de *Rhodnius prolixus*. _____41
- Figura 15:** Efeito da infecção por *T. rangeli* sobre a dinâmica de entradas e saídas de abrigos de ninfas de *Rhodnius prolixus*. _____42
- Figura 16:** Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* que permaneceram fora do abrigo duas horas após a retirada do hospedeiro. _____42
- Figura 17:** Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* que entraram nos abrigos após um período de três dias de aclimação. _44
- Figura 18:** Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* predadas. _____44
- Figura 19:** Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre a porcentagem de insetos sobreviventes que conseguiram se alimentar e realizar a muda. _____45
- Figura 20:** Avaliação do efeito potencial da infecção por *T. rangeli* sobre a porcentagem de insetos sobreviventes alimentados e que realizaram a muda. ____45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Balb/c – Linhagem de camundongos albinos da espécie *Mus musculus*

BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (estufa)

IV – Infra vermelho

LEDs – Light emitting diodes

LIT – *Liver Infusion Triptose* (meio de cultura celular para tripanosomatídeos)

L:E – Luz : Escuridão

M – molar

NaCl – Cloreto de sódio

NNN – *Neal, Novy, Nicolle* (meio de cultura para tripanosomatídeos)

n.s. – Não significativo (ao nível de 5%)

Par – Parasito

PBS – *Phosphate buffered saline* (solução de salina tamponada)

Ração *Ad libitum* – Ração à vontade

REML – Máxima verosimilhança restrita

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

Rhodnius prolixus é um inseto hematófago considerado principal transmissor do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, na Colômbia e Venezuela. Além do *T. cruzi*, ele pode transmitir o *Trypanosoma rangeli* a várias espécies de mamíferos, incluindo o homem. Durante o dia, estes insetos são encontrados no interior de abrigos, agregados com seus co-específicos em um estado de imobilidade denominado acinese. Durante a noite, estes insetos apresentam um perfil de atividade locomotora com dois picos característicos: um na primeira metade da escotofase, relacionado com a procura por hospedeiros e parceiros sexuais, e outro, na interfase entre o fim da fase escura e a fotofase, direcionado à procura de refúgios. Como seus hospedeiros são comumente vertebrados predadores de insetos, os triatomíneos podem ser mortos durante sua busca e o subsequente processo de alimentação. Desta maneira, o presente estudo avaliou se a infecção pelos tripanosomas acima citados altera o nível de atividade locomotora, os padrões de uso de abrigos e as taxas de predação sofridas por ninfas de *R. prolixus*. Além disso, avaliou-se a possibilidade de camundongos se infectarem ao ingerir ninfas infectadas com *T. rangeli*. Inicialmente, demonstrou-se que insetos infectados com *T. cruzi* apresentam uma diminuição nos níveis de atividade locomotora durante as primeiras horas da escotofase. Em contraste, a infecção por *T. rangeli* induziu a um aumento no nível de atividade locomotora durante praticamente todo o ciclo diário. Os padrões de uso de abrigos por ninfas infectadas com *T. cruzi* praticamente não foram alterados, porém esses insetos foram significativamente mais predados que insetos sadios. *Trypanosoma rangeli* modificou todos os parâmetros avaliados relacionados com o uso de abrigo. A infecção por este parasito aumentou a porcentagem de insetos que permaneceram fora dos abrigos, a exposição ao hospedeiro e conseqüentemente suas taxas de predação. Por fim, demonstrou-se que camundongos não se infectam com *T. rangeli* pela via oral. As alterações observadas, principalmente aquelas das taxas de predação, podem ter importantes implicações na transmissão de ambos os tripanosomatídeos na natureza, e são discutidas no presente trabalho.

ABSTRACT

The hematophagous insect *Rhodnius prolixus* is considered the main vector of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, in Colombia and Venezuela. In addition to *T. cruzi*, these insects can transmit *Trypanosoma rangeli* to different mammals, including humans. During daylight hours, triatomines remain hidden in shelters, aggregated with co-specifics in an immobility state called *akinesis*. During night time, these insects become active, presenting two locomotory peaks: one during the first half of the scotophase, related to host and sexual partner search, and another at the scotophase/photophase transition, when they return to their refuges. Triatomines can be eaten during host seeking and feeding because triatomine hosts are frequently insect predators. In this study, we evaluated whether infection by *T. cruzi* or *T. rangeli* influences the locomotor activity, the use of shelters and the predation rates suffered by *R. prolixus* nymphs. In addition, we evaluated whether mice can become infected with *T. rangeli* by ingestion of infected *R. prolixus* nymphs. *T. cruzi* infected insects exhibited a decreased locomotor activity level during the first hours of the scotophase. In contrast, *T. rangeli* infected insects showed increased locomotor activity during most daylight hours. *T. cruzi* infected nymphs did not show alterations in their patterns of shelter use. However, they suffered a significantly higher predation rate than healthy bugs. On the other hand, *T. rangeli* infected insects presented an altered pattern of shelter use. Specifically, these insects tended to remain out of their shelters, being exposed to their hosts and suffering higher predation rates. Finally, mice did not become infected by predating on *T. rangeli* infected insects. These behavioral changes, and especially the higher predation rates observed for infected insects, may have important implications for the transmission of both trypanosomatids in nature.

1 INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) são insetos predominantemente hematófagos, sendo essencial a ingestão de sangue para que estes completem seu ciclo de desenvolvimento. A procura e a exploração de seus recursos alimentares (forrageamento) são mediadas principalmente por três tipos de pistas do hospedeiro: calor, odores e umidade. Neste sentido, os triatomíneos dedicam grande parte de suas capacidades sensoriais para detectar sinais físicos e químicos emitidos por seus hospedeiros e para localizar a posição das suas fontes emissoras (Guerenstein & Lazzari, 2009). Porém, além de serem suas fontes de sangue, os hospedeiros dos triatomíneos são habitualmente seus potenciais predadores.

Os triatomíneos apresentam um padrão bimodal de atividade diária, deixando seus refúgios quando a intensidade de luz diminui e exibindo maior atividade durante as primeiras horas da escotofase (Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998; Ferreira, 2009). Essa forte fototaxia negativa e a atividade noturna parecem ser importantes para a sobrevivência destes insetos contra seus possíveis predadores.

Além da espoliação sanguínea que causam, os triatomíneos são também transmissores de protozoários como o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli*. O *T. cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, enfermidade parasitológica que afeta aproximadamente 7 milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2015). Apesar de sua patogenicidade ao hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* tem sido considerado como não patogênico ao hospedeiro invertebrado (Juarez, 1970; Schaub, 1988 a,b; Eichler & Schaub, 2002; Oliveira *et al.*, 2010). Ao contrário, o *T. rangeli* não é patogênico ao hospedeiro vertebrado, mas pode apresentar diferentes graus de patogenicidade ao hospedeiro invertebrado (Brecher & Wigglesworth, 1944; Lake & Friend, 1967; D'Alessandro 1976; Eichler & Schaub, 1998).

O comportamento dos triatomíneos vem evoluindo há milhões de anos em paralelo com seus parasitos naturais. Como resultado, a biologia destes insetos sofreu adaptações significativas que sustentam as infecções parasitárias em uma complexa rede de interações (vertebrados - vetores - parasitos). Entretanto, pouco se sabe sobre quais parâmetros comportamentais do grupo podem ser modificados, de alguma forma, pela presença e/ou efeitos de seus patógenos. Sendo assim, avaliar a dinâmica de utilização de refúgios e a busca e exploração de recursos alimentares por triatomíneos infectados, se torna essencial para tentar elucidar aspectos relacionados à transmissão por *T. cruzi* e de *T. rangeli* na natureza.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a infecção por *T. cruzi* ou *T. rangeli* influencia a atividade locomotora e os padrões de uso de abrigos de ninfas de *R. prolixus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a infecção por *T. cruzi* ou *T. rangeli* afeta:
 - a atividade locomotora de ninfas de *R. prolixus*;
 - os padrões de uso de abrigos em *R. prolixus*;
 - os índices de predação por hospedeiros em *R. prolixus*;

- Avaliar se camundongos se infectam ao ingerirem *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo reconhecidas até o momento 144 espécies na subfamília, agrupadas em 18 gêneros (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012; Almeida *et al.*, 2012; Jurberg *et al.* 2013). Estes insetos são paurometábolos, sendo seu ciclo de desenvolvimento constituído por cinco estádios ninfais seguidos pela fase adulta. As diferentes espécies de triatomíneos têm sua distribuição na área que vai do sul dos Estados Unidos até o norte da Patagônia Argentina (Galvão *et al.*, 2003; Reisenman *et al.*, 2012).

Os triatomíneos são insetos que vivem principalmente em habitats silvestres, e a maioria de suas espécies apresenta comportamento noturno. Conforme demonstrado para *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, esses insetos possuem dois picos de atividade locomotora característicos: um ao anoitecer relacionado à busca por hospedeiros vertebrados, e outro que antecede o amanhecer direcionado ao retorno aos abrigos, que fornecem proteção durante o dia (Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998; Ferreira, 2009). Durante o dia estes insetos são encontrados no interior dos abrigos (fendas de rochas, cascas e ocos de árvores, ninhos e tocas de animais silvestres) agregados e em um estado de imobilidade denominado acinese (Lorenzo & Lazzari, 1998). A entrada nos abrigos também é induzida pela intensa fototaxia negativa destes insetos (Mota & Lorenzo, 2012), por estímulos mecânicos do substrato e outros insetos da colônia (tigmotaxia), e por sinais químicos emitidos por co-específicos (Lorenzo & Lazzari, 1996; Figueiras & Lazzari, 2000). Tomados em conjunto, esses comportamentos configuram uma estratégia de sobrevivência fundamental para os triatomíneos, pois, além dos abrigos fornecerem um microclima estável com atenuadas variações de temperatura e umidade relativa (Lorenzo & Lazzari, 1999; Lorenzo *et al.*, 2000), evitar a exposição durante o período diurno diminui a possibilidade de encontro com possíveis predadores. Neste sentido, alterações dos padrões de utilização dos refúgios poderiam afetar substancialmente o sucesso reprodutivo diferencial destes insetos.

Os triatomíneos são encontrados em ecótopos silvestres em estreita associação com seus hospedeiros vertebrados. Entretanto, o desequilíbrio causado em seus habitats naturais por ações antrópicas facilitou a invasão de habitações humanas por algumas espécies, acelerando assim sua posterior adaptação. Neste contexto, o homem se tornou mais uma fonte de sangue para estes insetos, que

além da espoliação sanguínea que causam, foram identificados em 1909 como vetores da doença de Chagas (Chagas, 1909).

A doença de Chagas é uma enfermidade cujo agente etiológico é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que existam cerca de 7 a 8 milhões de pessoas infectadas pelo parasito, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica (WHO, 2015). A principal forma de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, responsável por 80% dos casos humanos (Dias, 1979; Schofield, 1994). Porém, com os programas de controle de tal enfermidade, outra forma que tem adquirido considerável relevância epidemiológica é a transmissão pela via oral. Nos últimos anos, tem sido relatado uma série de casos agudos graves da doença de Chagas provocados pela ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (Valente *et al.*, 1999; 2009; Nóbrega *et al.*, 2009). Os surtos de transmissão oral de *T. cruzi* em humanos reforçam a importância dessa rota de transmissão na natureza.

Além do ciclo antrozoontótico da doença de Chagas, o *T. cruzi* sempre existiu na natureza como componente de uma enzootia silvestre que afeta mamíferos, ou seja, circulando entre estes e os triatomíneos. Muito provavelmente essa transmissão ocorre pela via oral, pois, como citado na literatura, a possibilidade de transmissão do *T. cruzi* pelas fezes (transmissão estercoreária) acontece de forma esporádica (Rabinovich *et al.*, 1990, 2001; Basombrío *et al.*, 1996; Nouvellet *et al.*, 2013). Soma-se a essa evidência o fato de edentados, marsupiais e primatas, fontes alimentares de triatomíneos, serem comumente relatados como seus potenciais predadores. Nesse sentido, essa forma de transmissão parece mais plausível que a estercoreária, uma vez que nesta o parasito precisaria transpor a densa camada de pelos que recobrem esses animais (Roque *et al.*, 2008).

Rhodnius prolixus destaca-se por ser susceptível à infecção por *T. cruzi*, ser altamente sinantrópico e capaz de colonizar domicílios em elevadas densidades, fatores que o definem como uma das mais eficientes espécies transmissoras (Sandoval *et al.*, 2000; Dorn *et al.*, 2001). Devido a essas características, *R. prolixus* é o principal transmissor da doença de Chagas na Venezuela e Colômbia (Schofield & Galvão, 2009; Vallejo *et al.*, 2009). Além da sua importância epidemiológica, *R. prolixus* também é um importante modelo experimental de laboratório para estudos de fisiologia e comportamento de insetos (Wigglesworth, 1936; Schofield, 1994).

Trypanosoma cruzi foi descoberto por Carlos Chagas em 1909, e pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. No inseto vetor o ciclo de vida do

T. cruzi se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas juntamente com o repasto realizado em mamíferos infectados. No intestino médio posterior do inseto, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas replicativas (Ferreira, 2014), o colonizam e chegam ao reto. Na ampola retal as formas epimastigotas sofrem um processo de metacicloênese e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, não replicativas (Kollien & Schaub, 2000). As formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas juntamente com as fezes e poderão ser transmitidas a um novo hospedeiro mamífero em repastos sanguíneos subsequentes. A transmissão acontece através da deposição de fezes e urina infectadas em mucosas ou em locais próximos à lesão tecidual causada pela picada.

As formas tripomastigotas metacíclicas penetram na pele lesada do hospedeiro mamífero e podem invadir os diferentes tipos celulares. Neles os parasitos se multiplicam sob a forma amastigota e posteriormente se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que rompem a célula infectada e entram na circulação (Brener, 1973; Zeledón, 1987).

Trypanosoma rangeli é outro importante tripanosomatídeo transmitido pelos triatomíneos. Este parasito foi descrito por Tejera em 1920, e pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subgênero *Herpetosoma* (Levine *et al.*, 1994). O *T. rangeli* compartilha com o *T. cruzi* hospedeiros triatomíneos (principalmente os do gênero *Rhodnius*) e mamíferos. Os dois parasitos são capazes de coexistir nestes hospedeiros, sustentando infecções mistas (D'Alessandro & Saravia 1999). Dessa maneira, *T. rangeli* possui um papel relevante para a saúde pública, pois pode causar reações sorológicas cruzadas com antígenos de *T. cruzi* que dificultam o diagnóstico da infecção chagásica no homem (Coura *et al.*, 1996, Hudson *et al.*, 1988; Guhl & Vallejo, 2003). De maneira semelhante ao descrito para *T. cruzi*, a fase vetorial do ciclo de vida de *T. rangeli* se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas juntamente com o repasto em um hospedeiro mamífero infectado. Dentro do intestino anterior do inseto, os parasitos se diferenciam para a forma epimastigota que se divide e coloniza todo o trato intestinal (Ferreira, 2014). Entretanto, *T. rangeli* tem a capacidade de atravessar o epitélio intestinal e alcançar a cavidade celômica. Uma vez na hemocele, os parasitos se multiplicam, migram e, eventualmente, penetram as glândulas salivares onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que poderão ser transmitidos a um novo hospedeiro mamífero durante a ingestão de sangue (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo & Saraiva, 1992). No

hospedeiro mamífero, entretanto, o desenvolvimento do *T. rangeli* ainda não é bem conhecido. Añez (1981) e Añez e colaboradores (1985), não conseguiram encontrar formas de *T. rangeli* (cepa Perro/78) através das técnicas de xenodiagnóstico ou hemocultura aplicadas a camundongos e *Didelphis marsupialis* 60 dias após a sua infecção experimental. Entretanto, outros autores recuperaram formas deste parasito em camundongos previamente infectados em períodos que variaram de 4 a 18 meses (Paredes & Paredes, 1949; Groot *et al.*, 1950, Steindel, 1993; Ferreira, 2013). Até o momento, nenhum estudo conseguiu demonstrar como e onde o *T. rangeli* se multiplica nos mamíferos.

A partir do momento em que parasitos são ingeridos junto com o repasto sanguíneo são iniciadas interações entre estes e seus hospedeiros invertebrados. Algumas delas ocorrem na interface entre células ou tecidos, outras ocorrerão a partir de produtos secretados pelos parasitos, e outras ainda, se darão por respostas do vetor geradas a partir da chegada do parasito. Muitas dessas interações parasito-hospedeiro podem levar a mudanças na fisiologia e no comportamento de diversos insetos vetores, afetando inclusive, as taxas de transmissão do parasito (Molyneux & Jefferies, 1986; Schaub, 1989; 1992; Killick-Kendrick & Molyneux, 1990; Alekseev, 1992; Hurd, 2003).

Trypanosoma cruzi tem sido considerado como não patogênico para os triatomíneos (Juarez, 1970; Schaub, 1988 a,b; Eichler & Schaub, 2002; Oliveira *et al.*, 2010). Juarez (1970) demonstrou que *T. infestans* infectados por *T. cruzi* apresentaram uma duração do seu desenvolvimento sem alterações significativas. O mesmo foi constatado por Schaub (1988 a,b) que adicionalmente observou que o parasito não afeta as taxas de sobrevivência desses insetos. Eichler & Schaub (2002) investigaram se as populações de simbioses intestinais de *R. prolixus* e *T. infestans* seriam alteradas pela presença do parasito e não encontraram evidências significativas deste fenômeno. Oliveira e colaboradores (2010) não constataram diferenças significativas na mortalidade, no desempenho reprodutivo e nem na duração da muda de *Triatoma brasiliensis* infectados por *T. cruzi* quando estes parâmetros foram comparados com os de insetos sadios.

Apesar da falta de efeitos deletérios causados por *T. cruzi* conforme descrito acima, alguns estudos têm relatado que alguns triatomíneos podem sofrer alterações induzidas pela infecção por estes parasitos. Schaub & Lösch (1989) observaram que ninfas em jejum de quarto e quinto estádios de *T. infestans* infectadas por *T. cruzi* apresentaram uma redução de 14% e 17% na sua

longevidade, respectivamente. Os autores sugeriram que essa redução na resistência ao jejum pode ter sido devido a uma competição por nutrientes entre os parasitos e os triatomíneos. Segundo demonstrado por Botto-Mahan e colaboradores (2006), a infecção de *Mepraia spinolai* promoveu uma diminuição significativa no tempo de detecção de hospedeiros e na duração do intervalo entre o final do repasto sanguíneo e a primeira dejeção. A velocidade de dejeção é um importante fator na transmissão do parasito, pois aumenta a possibilidade desta ser depositada nos hospedeiros, e inclusive é um dos parâmetros comportamentais utilizados para caracterizar a competência vetorial dos triatomíneos (Dias,1979; Oliveira *et al.*, 2009). Interessantemente, um estudo conduzido no México avaliou a dinâmica de infestação por *Triatoma dimidiata* e sugeriu que a infecção pelo *T. cruzi* promove um aumento na taxa de dispersão das fêmeas da espécie (Ramirez-Sierra *et al.*, 2010). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a infecção por *T. cruzi* diminui significativamente a capacidade de *R. prolixus* de converter o sangue ingerido em ovos, bem como as taxas de eclosão destes, dependendo da temperatura em que foram criados os insetos (Fellet *et al.*, 2014).

Ao contrário de *T. cruzi*, *T. rangeli* não é considerado patogênico para o homem, contudo, pode apresentar diferentes graus de patogenicidade para os insetos vetores (Brecher & Wigglesworth, 1944; Lake & Friend, 1967; D'Alessandro 1976; Eichler & Schaub, 1998). *Trypanosoma rangeli* promove uma redução no número de simbiossomas presentes no trato intestinal dos triatomíneos, o que leva a uma série de efeitos deletérios para os vetores. Brecher & Wigglesworth (1944) demonstraram que a ausência de bactérias simbiossomas promove retardos no desenvolvimento das ninfas de *R. prolixus*, fazendo com que poucas cheguem à fase adulta. Um importante simbiossoma que quando ausente promove atrasos na ecdise ninfal desse triatomíneo é *Nocardia rhodnii* (Lake & Friend, 1967). A diminuição do número de microorganismos comensais que colonizam o intestino dos triatomíneos pode ainda promover distúrbios na digestão e excreção (Brecher & Wigglesworth, 1944; Eichler & Schaub, 1998), e reduções no do sistema traqueal (Eichler & Schaub, 1998).

Além das alterações na microbiota intestinal a infecção pelo *T. rangeli* promove um aumento das taxas de mortalidade dos triatomíneos. Grewal (1957) foi o primeiro a relatar esse efeito sobre a sobrevivência de ninfas de *R. prolixus*. O autor observou ainda que muitos dos insetos que sobrevivem apresentam alterações da sua morfologia externa. Posteriormente, Tobie (1965) quantificou as taxas de

sobrevivência de ninfas infectadas por este parasito e constatou uma redução de 22% na quantidade de insetos que sobrevivem e chegam ao estágio adulto. Efeitos semelhantes foram demonstrados por Añez (1984) com *R. prolixus* e *Rhodnius robustus* que, quando infectados apresentaram mortalidade de 39% e 46%, contra 5% e 12% dos insetos sadios, respectivamente.

Garcia e colaboradores (1994) demonstraram que a infecção das glândulas salivares de *R. prolixus* por *T. rangeli* prejudica a ingestão de sangue. Adicionalmente, esses parasitos promovem uma redução da quantidade de proteínas estocadas nas glândulas salivares, dentre elas as nitroforinas (Paim *et al.*, 2013) que atuam na vasodilatação e na inibição da agregação plaquetária durante a ingestão de sangue por estes insetos (Andersen *et al.*, 2005). Essas moléculas anti-hemostáticas são fundamentais para o sucesso da ingestão sanguínea (Ribeiro *et al.*, 2004). Garcia e colaboradores (1994) constataram ainda, que ninfas com glândulas infectadas realizam significativamente mais picadas no hospedeiro durante a tentativa de obtenção de um repasto sanguíneo. Tais alterações poderiam ocasionar um aumento da probabilidade de transmissão de *T. rangeli* (Garcia *et al.*, 1994), devido à maior dificuldade do triatomíneo para canular os vasos sanguíneos. Consequentemente, o aumento no número de picadas poderia garantir a liberação de mais parasitos e uma maior exposição ao hospedeiro, provavelmente potencializando a probabilidade de que o inseto seja predado.

Nosso grupo demonstrou que a presença do *T. rangeli* na hemolinfa de *R. prolixus* prolonga o período intermudas e leva a um aumento da quantidade de lipídeos e no peso do corpo gorduroso nos insetos (Ferreira *et al.*, 2010). Além disso, o grupo também mostrou que a infecção afeta negativamente uma série de parâmetros reprodutivos em *R. prolixus*, já que prolonga o intervalo de pré oviposição, reduz a fecundidade e as taxas de eclosão de ovos postos pelos insetos (Fellet *et al.*, 2014).

Uma das questões centrais da parasitologia é até que ponto alterações promovidas por parasitos são consequências indiretas da infecção ou manipulações para promover sua transmissão e/ou sobrevivência (Hurd, 2003). Alterações do estado nutricional, de comportamentos sociais e de reações à temperatura, luz e umidade podem afetar as taxas de transmissão, especialmente das formas imaturas, a um hospedeiro definitivo (Schaub, 1989a). A transmissão oral é um claro exemplo de rota de transmissão que pode favorecer a dispersão do *T. cruzi*. Brumpt (1913b) foi o primeiro a demonstrar a transmissão oral de *T. cruzi*, ao colocar fezes de

triatomíneo infectado (do extinto gênero *Conorhinus*) na boca de camundongos. Posteriormente, diversos trabalhos com cobaias promoveram a ingestão de insetos infectados, ou de fezes dos mesmos, e comprovaram a infecção por este parasito (Nattan-Larrier, 1921; Kofoid & Donat, 1933b; Cardoso, 1933; Hoft *et al.*, 1996; Rabinovich *et al.*, 2001; Coffield *et al.*, 2013). Apesar de a literatura demonstrar que hospedeiros vertebrados se infectam com *T. cruzi* pela via oral, esta forma de transmissão não tem sido demonstrada para *T. rangeli*.

Mudanças no perfil de atividade locomotora de invertebrados provocadas pela infecção por parasitos têm sido evidenciadas em diversos sistemas de interação (Adamo *et al.*, 1995, Alekseev, 1996; Kamita *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2009; Lima-Camara *et al.*, 2011). Adamo e colaboradores (1995) demonstraram que o grilo *Gryllus integer* apresenta atividade locomotora diminuída quando parasitado por larvas da mosca *Ormia ochracea*. De maneira semelhante, a infecção pela bactéria *Borrelia burgdorferi* induz um declínio na locomoção de seu hospedeiro, o carrapato *Ixodes scapularis*. Em contrapartida, carrapatos infectados com o vírus da encefalite *Borrelia burgdorferi* (Alekseev, 1996), assim como a mariposa da seda *Bombyx mori* quando infectada por baculovírus (Kamita *et al.*, 2005) apresentaram elevadas taxas de atividade. A infecção por *Wolbachia pipientis*, aumenta o nível de atividade de *A. aegypti* (Evans *et al.*, 2009), assim como a infecção pelo vírus dengue (Lima-Camara *et al.*, 2011).

O parasitismo é por definição uma interação ecológica interespecífica e desarmônica, onde o parasito se beneficia à custa do organismo hospedeiro. Neste sentido, é natural que como consequência de uma infecção parasitária uma série de alterações fisiológicas e comportamentais aconteçam no hospedeiro. Embora os estudos sobre a fisiologia do comportamento de triatomíneos tenham avançado de forma relevante (Di Luciano, 1983; Lazzari & Nunez, 1989; Lazzari, 1991; Roca & Lazzari, 1994; Canals *et al.*, 1997; Lorenzo & Lazzari, 1996, 1998, Guarneri *et al.*, 2002, 2003), pouco se sabe ainda sobre quais parâmetros comportamentais do grupo podem ser modificados pela presença e/ou efeitos patogênicos causados pelos parasitos mencionados acima. Estes estudos se revestem de fundamental importância uma vez que, modificações de certos comportamentos relacionados com a busca do hospedeiro poderiam levar a alterações na distribuição espacial e temporal dos insetos, alterando também suas interações com os hospedeiros, que são habitualmente seus potenciais predadores.

A utilização do abrigo é um comportamento marcante e característico em triatomíneos. Para deixarem a segurança dos refúgios é necessária a expressão de uma série de eventos fisiológicos de origem endógena em associação com a presença de estímulos externos sem os quais dificilmente estes insetos se arriscam na procura do hospedeiro vertebrado. Pouco antes do anoitecer, o relógio circadiano dos triatomíneos marca o início de um novo ciclo de atividade (Lazzari, 1992). Dependendo do estado nutricional (Bodin *et al.*, 2008) e da maturação dos seus receptores olfativos (Latorre-Estivalis *et al.*, 2013), o inseto deixará o refúgio à procura de fontes alimentares ou parceiros sexuais. Durante o período noturno o inseto permanece fora do abrigo e poucas horas antes do amanhecer o sistema circadiano motiva-o a retornar ao refúgio (Lorenzo & Lazzari, 1998). Compostos voláteis presentes nas fezes de triatomíneos acumuladas nos acessos dos abrigos guiam este retorno (Lorenzo & Lazzari, 1996). Os triatomíneos passam grande parte do período diurno nos abrigos, locais com iluminação reduzida que fornecem proteção contra a ação de seus possíveis predadores.

No presente trabalho avaliamos se a atividade locomotora e o uso de abrigos podem ser alterados quando *R. prolixus* se encontra infectado por *T. cruzi* ou *T. rangeli*. Além disso, estudamos se a infecção por estes parasitos pode promover um aumento nas taxas de predação destes insetos que conseqüentemente poderiam potencializar a probabilidade de transmissão ao hospedeiro vertebrado pela via oral. Finalmente, avaliamos se camundongos podem se infectar com *T. rangeli* pela via oral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Triatomíneos

Os exemplares de *R. prolixus* que foram utilizados no estudo são provenientes de uma colônia mantida pelo Grupo de Comportamento e Interação com Patógenos do Centro de Pesquisa René Rachou. Os insetos foram criados em frascos de acrílico cilíndricos com base de 15 cm de diâmetro e altura de 19 cm, forrados com papel filtro, contendo uma tira de cartolina dobrada em forma de sanfona para aumentar a superfície interna disponível para a locomoção dos insetos e fechados com tecido de algodão na parte superior.

Os insetos foram alimentados quinzenalmente em galinhas ou camundongos anestesiados com uma mistura de ketamina 150 mg/kg (Cristalia – Brasil) e xilazina 10 mg/kg (Bayer – Brasil), de acordo com as normas do Comitê de Ética na Utilização de Animais da FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ-MG) sob o número LW-61/2012. A sala do insetário foi mantida a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\pm 10\%$ e ciclo natural de iluminação.

4.2 Parasitos

Para este estudo foram utilizadas culturas de *T. cruzi* da cepa CL, isolada de *T. infestans* naturalmente infectado (Brener & Chiari, 1963) e de *T. rangeli* da cepa CHOACHI, isolada das glândulas salivares de *R. prolixus* também naturalmente infectados (Schotelius, 1987). Os parasitos foram cultivados em tubos cilíndricos de vidro mantidos em estufa BOD a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para garantir a viabilidade das culturas duas passagens semanais foram realizadas em meio LIT (*liver-infusion tryptose*). A cada três meses as culturas eram submetidas a uma passagem em meio Ágar/sangue + LIT (NNN+LIT), para complementar o aporte nutricional. Ambos os meios eram suplementados com 15% de soro bovino fetal, 100 μg de estreptomicina/mL e 100 unidades de penicilina/mL.

4.3 Infecção de *Rhodnius prolixus*

Trypanosoma cruzi:

Ninfas de segundo estágio foram alimentadas sete dias após a ecdise em alimentador artificial com sangue de coelho citratado obtido do Centro de Criação de Animais de Laboratórios da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL FIOCRUZ- RJ). O

sangue teve seu plasma previamente inativado (56°C, 30 min), e nele foi adicionado uma suspensão de epimastigotas de cultura de *T. cruzi* na concentração de 1×10^7 parasitos/ml (Fellet *et al.*, 2014). Insetos alimentados apenas com sangue de coelho citratado inativado foram utilizados como controle. Subsequentemente, ambos os grupos foram alimentados em camundongos anestesiados até chegarem ao quinto estágio. Após a muda para o quinto estágio, os insetos foram mantidos em jejum por 30 dias, quando foram utilizados nos ensaios.

Trypanosoma rangeli:

Ninfas de terceiro estágio foram alimentadas sete dias após a ecdise em alimentador artificial com sangue de coelho citratado, que teve seu plasma previamente inativado (56°C, 30 min), adicionado com uma suspensão de epimastigotas de cultura de *T. rangeli* na concentração de 1×10^6 parasitos/mL (Ferreira *et al.*, 2010). Sete dias após a muda para o quarto estágio, as ninfas foram inoculadas com doses de 1µl de tampão fosfato salina estéril (PBS 0,15M NaCl em 0,01M fosfato de sódio, pH 7,4) contendo aproximadamente 100 parasitos (1×10^5 par/ml). A infecção através do inóculo de epimastigotas na cavidade celômica dos insetos foi utilizada para garantir a presença de parasitos na hemolinfa, uma vez que nas infecções pela via oral os parasitos nem sempre conseguem atravessar o epitélio intestinal e completar a infecção (Marinkelle, 1968; Añez *et al.*, 1987). Um dia após a sua inoculação, ambos os grupos foram alimentados em camundongos anestesiados. Os triatomíneos foram utilizados 30 dias após a muda para o quinto estágio. Antes dos ensaios, a hemolinfa dos insetos foi examinada para confirmar a presença de parasitos e somente insetos positivos foram incluídos nos experimentos. Insetos de terceiro estágio alimentados apenas com sangue de coelho e inoculados com PBS estéril no quarto estágio foram utilizados como controle.

4.4 Atividade locomotora

A atividade locomotora dos insetos foi avaliada com o auxílio de um sistema automatizado de registro de dados de atividade locomotora, actômetro, que foi desenvolvido para o experimento pela nossa equipe e dois técnicos contratados para tal finalidade. Este dispositivo consiste de 40 unidades individuais (5cm x 10cm x 2cm) dispostas em uma placa de metal (Figura 1). Cada unidade contém três pares de fotodiodos emissores de luz infravermelha-IV (LEDs, *light emitting diodes*),

posicionados frente a frente com seus respectivos receptores. Os LEDs foram instalados de maneira equidistante ao longo do lado mais comprido do espaço retangular de cada unidade, de maneira que ofereciam cobertura à maior parte do espaço onde o inseto podia se locomover. Dentro de cada unidade foi colocada uma arena de acrílico transparente (4,5cm x 9,5cm x 1,5cm) onde os insetos eram liberados individualmente para os ensaios. Como os triatomíneos não percebem comprimentos de onda da iluminação IV emitida pelos LEDs (Reisenman *et al.*, 2002), o sistema é baseado no fato de que qualquer movimentação do inseto dentro da arena que interrompa o feixe de luz IV, faz com que os detectores IV enviem sinais de movimento ao computador associado ao sistema para que os armazene.

Para os ensaios, uma ninfa era liberada no centro de cada arena (n=18 controle, n=18 infectado; 3 ensaios com *T. cruzi* e 6 com *T. rangeli*). Uma vez dentro de cada arena os insetos tiveram sua movimentação registrada durante seis dias consecutivos. O experimento foi realizado em condições controladas de iluminação e temperatura (fotoperíodo de 12 horas e $24\pm 1^{\circ}\text{C}$).

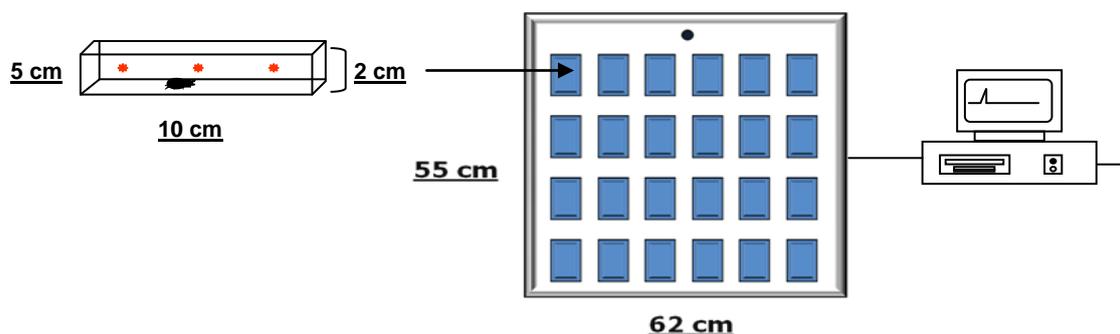


Figura 1: Representação esquemática do actômetro. Os retângulos azuis representam as unidades (40), que foram dispostas sobre uma placa de metal. No detalhe à esquerda, uma unidade apresenta os três pares de fotodiodos IV indicados pelos pontos vermelhos. Arenas de acrílico transparente fechadas com uma tampa transparente foram usadas para conter os insetos durante os ensaios.

4.5 Uso de abrigos

A dinâmica de utilização de abrigos por ninfas de *R. prolixus* infectadas com *T. cruzi* ou *T. rangeli* foi estudada através de filmagens do seu comportamento segundo metodologia descrita por Lorenzo e Lazzari (1998), com modificações. Um grupo de 50 ninfas foi liberado no final da fase clara do ciclo diário em uma arena de

vidro (40cm x 40cm x 20cm) cujo substrato foi forrado com papel filtro. A arena apresentava no centro um abrigo artificial (Lorenzo & Lazzari 1996) feito com um pedaço de papelão corrugado de 20 x 10 cm, dobrado ao meio de forma a gerar um refúgio de 10cm² com dois acessos laterais de aproximadamente 0,5cm de altura (Figura 2). Duas arenas experimentais idênticas colocadas lado a lado foram utilizadas para realizar dois ensaios simultâneos e registrar em paralelo o comportamento de um grupo de insetos não infectados e outro de insetos infectados com um dos parasitos estudados. Os grupos de insetos foram liberados próximos ao vértice esquerdo de cada arena e nela permaneceram por um período de 72h, para que os triatomíneos pudessem se adaptar às condições ambientais do experimento, reconhecer e acessar os abrigos. Após esse período, as ninfas que permaneceram fora dos abrigos foram retiradas e contabilizadas. Um frasco plástico cilíndrico (10 cm de altura x 8 cm de diâmetro), fechado com uma tampa plástica perfurada e contendo um camundongo (peso ≈ 39g), foi colocado entre os vértices do lado direito de cada arena. Funcionalmente, o frasco impediu o contato físico dos insetos com o camundongo, o que conseqüentemente impossibilitou a alimentação de ambas as partes, mas permitiu que os estímulos químicos (odores) e físicos (vibração e calor) fossem dissipados, sinalizando a presença de um hospedeiro. Os camundongos foram colocados nas arenas 2 horas antes do fim da fase clara, permaneceram nelas durante toda a fase de escuridão e foram retirados 2 horas após o início da seguinte fase clara (durante este período de 16 horas, os camundongos receberam água e ração *ad libitum*). Uma câmera de vídeo sensível a luz infravermelha localizada sobre as arenas registrou a posição e movimentos dos insetos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: atividade de entrada e saída do abrigo durante o período de aclimação, porcentagem de insetos que entraram no abrigo antes da introdução do hospedeiro, porcentagem de insetos fora do abrigo na presença do hospedeiro e porcentagem de insetos que permaneceram fora do abrigo 2 horas após a retirada do hospedeiro. Para o cálculo da porcentagem de insetos fora do abrigo na presença do hospedeiro foi calculado um balanço entre saídas e entradas do abrigo (saídas – entradas). Os experimentos foram realizados em uma sala com condições de temperatura e iluminação controladas (12:12 L/E e 24±1°C).

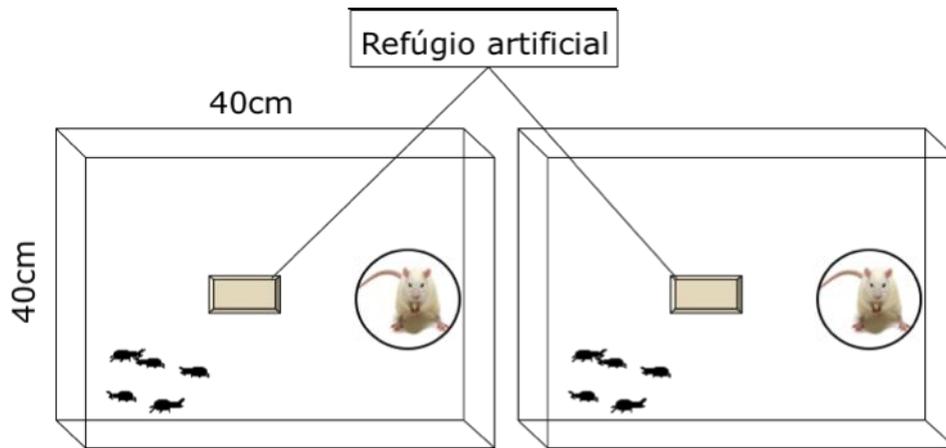


Figura 2: Desenho experimental para o estudo dos padrões de uso dos abrigos. Os quadrados representam as arenas de vidro e ao centro o abrigo artificial de papelão corrugado.

4.6 Predação

Com a finalidade de determinar se as taxas de predação de insetos infectados (*T. cruzi* ou *T. rangeli*) são aumentadas em comparação com as de insetos saudáveis, foram realizados ensaios complementares. A metodologia deste experimento foi semelhante à descrita no item 3.5 “Uso de Abrigos”, entretanto, após o período de 72 horas de aclimatação, uma gaiola de aço (10cm x 6cm x 10cm) contendo um camundongo (peso \approx 39g e com jejum de 3 horas) foi colocada entre os vértices do lado direito em cada uma das arenas (Figura 3). Essa gaiola permitiu o contato dos triatomíneos com o hospedeiro e vice-versa, durante o mesmo intervalo de 16 horas (neste ensaio o camundongo recebeu água *ad libitum* durante todo o experimento). Foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de insetos que entraram no abrigo antes da introdução do hospedeiro, porcentagem de insetos predados pelo hospedeiro e porcentagem de insetos que conseguiram obter um repasto e retornar ao abrigo. Todo o experimento foi registrado mediante o uso de uma câmera de vídeo sensível a luz infravermelha.

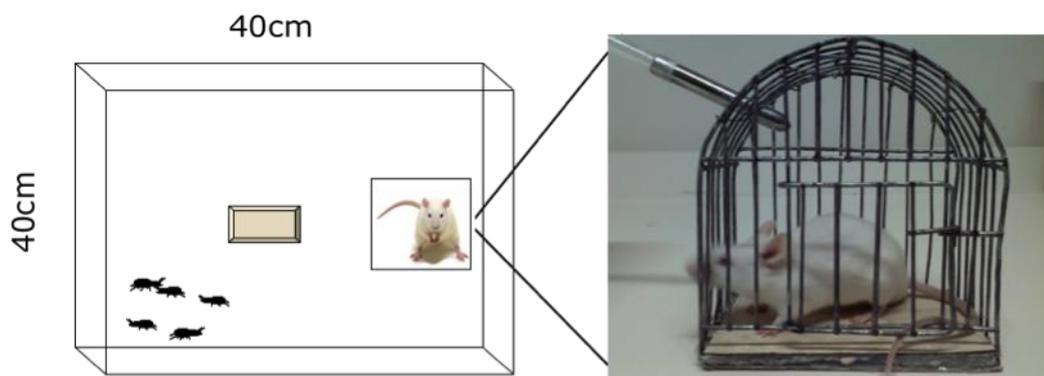


Figura 3: Desenho experimental para a avaliação das taxas de predação. À direita, detalhe da gaiola de aço que acomodou o camundongo.

4.7 Infecção Oral

Para avaliar se *T. rangeli* pode ser transmitido ao hospedeiro vertebrado através da via oral, ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* previamente infectadas foram colocadas em arenas de vidro (40 x 40 x 20 cm) com camundongos da espécie *Mus musculos*, linhagem Balb/c (3 horas de jejum). Um dia antes do experimento, as ninfas tiveram suas probóscides cortadas com o intuito de garantir que as mesmas não pudessem transmitir parasitos através da picada. Foram feitos 10 ensaios, sendo que em cada um foram liberados na arena um camundongo e três ninfas durante um intervalo de 1 hora, o que permitia que os camundongos se alimentassem dos insetos. Após a interação, os camundongos foram separados, identificados e posteriormente examinados, por xenodiagnóstico. No primeiro dia após a predação e durante seis dias consecutivos cada um dos dez camundongos foi anestesiado e posteriormente oferecido durante 40 minutos a um grupo de três ninfas de quinto estágio não infectadas e com 30 dias de jejum. Esse procedimento foi repetido ainda no 15º dia pós-interação. Após o término da alimentação, as ninfas foram transferidas para estufas BOD ($27\pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 L:E) e mantidas nessas condições por 21 dias, quando seu conteúdo intestinal, hemolinfa e glândulas salivares foram examinados para a procura de parasitos.

Trinta dias após a realização dos ensaios, os camundongos foram anestesiados, dessangrados e o sangue transferido para tubos de cultura contendo 2 ml de meio LIT. Após um período de 20 dias, a hemocultura foi examinada.

4.8 Análise dos resultados

Atividade locomotora

Nos ensaios de atividade locomotora as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote informático R 3.0.2 (R Development Core Team 2013). A normalidade dos dados obtidos foi avaliada através do teste Shapiro-Wilks. A intensidade da atividade locomotora de *R. prolixus* foi analisada utilizando modelos lineares de efeitos mistos (função *lmer* no pacote *lme4* [Bates *et al.*, 2014]) ajustados através da máxima verossimilhança restrita (REML). Os dados de atividade locomotora transformados em raiz quadrada foram utilizados como variável de resposta, enquanto o tratamento (controle vs. infectado) e as horas do dia foram definidos como variáveis fixas. Contrastes par a par (interação dos testes de função no pacote *phia* [de Rosario-Martinez, 2013]) foram utilizados para avaliar a atividade locomotora dos insetos controle e infectados a cada hora do dia. Os valores de P obtidos nos contrastes foram ajustados pelo método de Holm-Bonferroni para corrigir o problema de comparações múltiplas. As comparações entre os grupos, onde apenas os insetos ativos foram considerados, foram posteriormente realizadas através de uma análise de variância ou do teste não-paramétrico Mann-Whitney, dependendo da normalidade da amostra de dados.

Uso de abrigos e predação

A comparação entre frequências foi feita através do teste do Qui-quadrado, teste que analisa as proporções de um determinado evento. O nível de significância aceito foi de p igual ou menor que 0,05 (95%).

5 RESULTADOS:

5.1 Atividade locomotora

O padrão de atividade das ninfas de *R. prolixus* em ambos os grupos avaliados foi semelhante ao já descrito em estudos realizados com outras espécies de triatomíneos. O primeiro pico de atividade locomotora se deu durante a primeira hora da fotofase, seguido por um período de 12 horas de baixa locomoção. O segundo pico de atividade foi registrado somente na segunda hora da escotofase e marcou o início de um período de muita movimentação que decaiu gradativamente com o decorrer das horas (Figuras 4 e 5). Adicionalmente, foi possível observar que a infecção parasitária afetou diferencialmente o perfil e a intensidade da atividade locomotora de *R. prolixus*.

A atividade locomotora das ninfas de *R. prolixus* infectadas com *T. cruzi* e do seu respectivo grupo controle foi semelhante durante todo o período da fotofase (Figuras 4 e 5). Interessantemente, o grupo infectado apresentou atividade locomotora significativamente menor durante o período da escotofase quando comparado ao grupo controle (figuras 4 e 5). Essa diferença pôde ser observada durante o pico de atividade noturna e nas quatro horas subsequentes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). O número total de movimentos dos insetos infectados foi 20% menor do que o observado para os insetos não infectados.

O número de insetos ativos (insetos que apresentaram pelo menos um evento de movimentação por hora) por tratamento está mostrado na figura 6. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados (Mann-Whitney, n.s.). Entretanto, o número de movimentos realizados pelos insetos ativos infectados por *T. cruzi* foi significativamente menor durante a escotofase (Figura 7; Mann-Whitney, $p < 0,0005$).

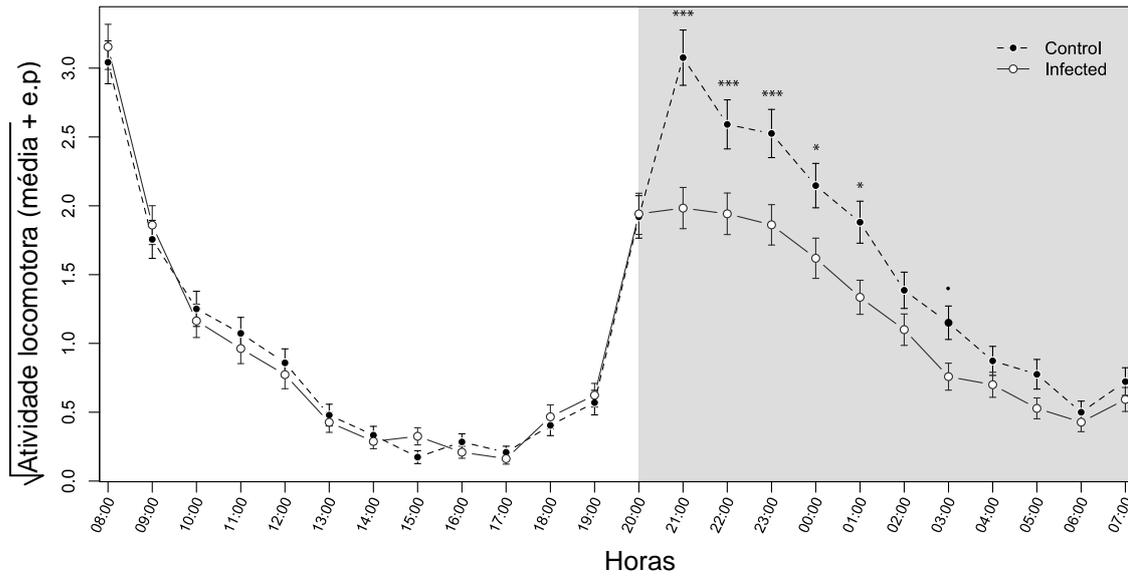


Figura 4: Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre o perfil de atividade locomotora de ninfas de *Rhodnius prolixus*. As áreas branca e cinza representam a fotofase e escotofase, respectivamente. Os dados são apresentados como a média da raiz quadrada da atividade locomotora de três ensaios (n = 18 insetos por tratamento em cada ensaio; • p<0,1, * p<0,05, *** p<0,001).

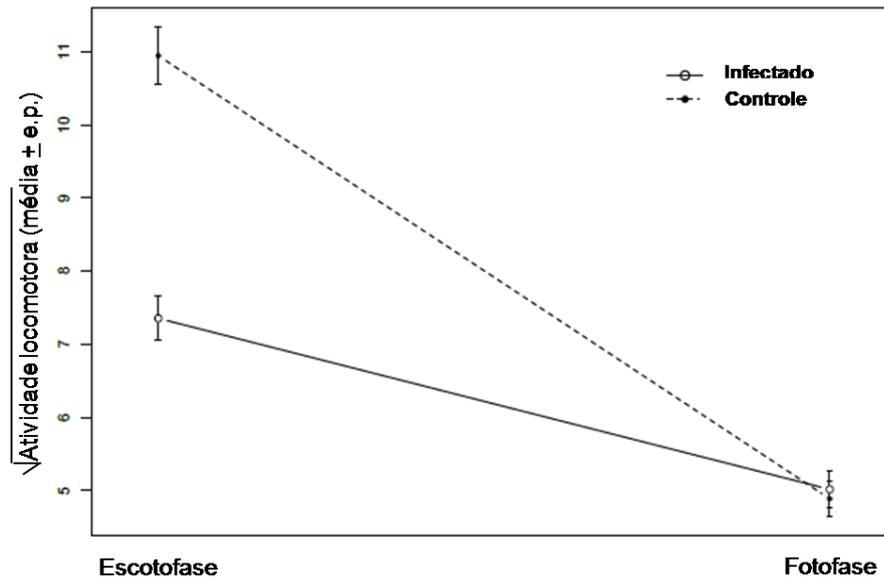


Figura 5: Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre o número total de movimentos de ninfas de *Rhodnius prolixus*. Os dados apresentados representam a raiz quadrada da atividade locomotora acumulada após seis dias de avaliação e são discriminados entre as fases de escuridão e luz.

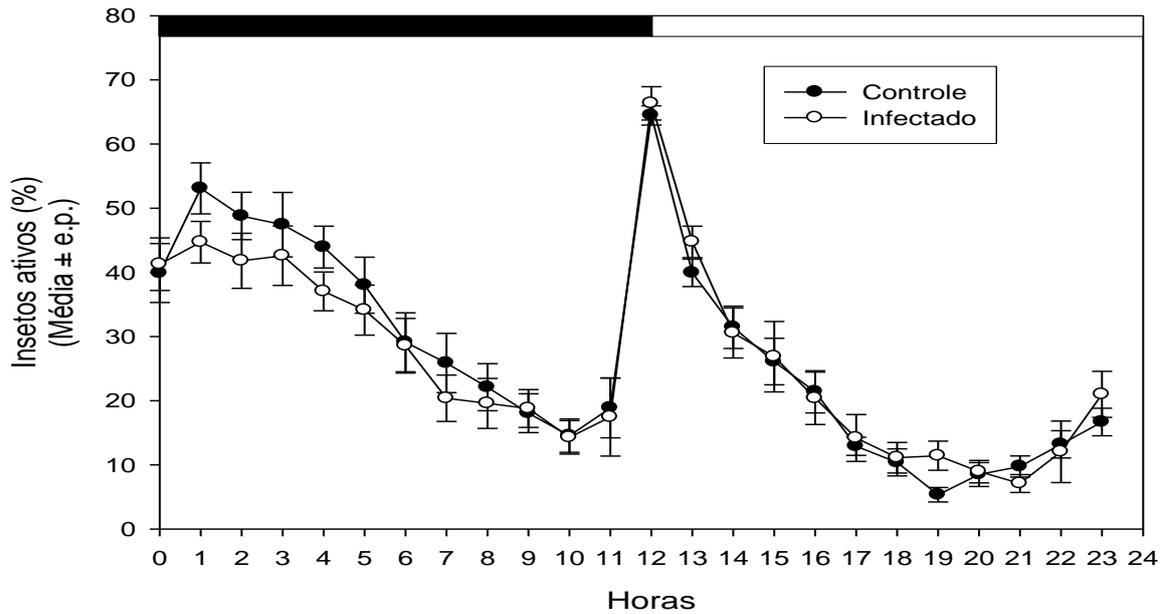


Figura 6: Efeito da infecção por *T. cruzi* na porcentagem de insetos ativos. As barras horizontais representam a escotofase (preto) e a fotofase (branco). Os dados representam a média de três ensaios cada um com 18 insetos por tratamento (Mann-Whitney, n.s.).

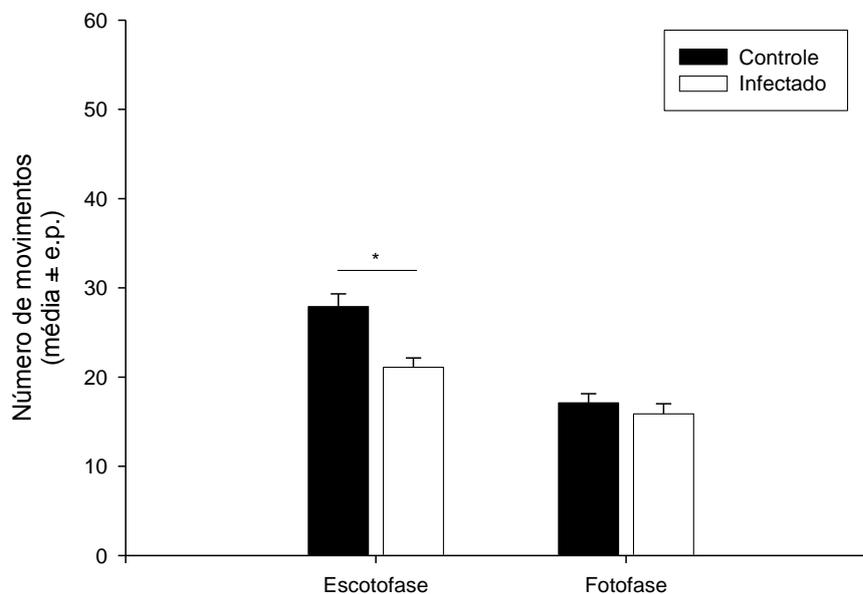


Figura 7: Efeito da infecção por *T. cruzi* no número de movimentos apresentados por insetos ativos. Os dados representados são a média de três ensaios cada um com 18 insetos por tratamento (*Mann-Whitney, * $p < 0,0005$).

A análise dos efeitos da infecção por *T. rangeli* na atividade locomotora de *R. prolixus*, mostrou que a presença do parasito parece induzir um aumento generalizado nos níveis de locomoção durante todo o ciclo diário (Figuras 8 e 9). O nível de atividade locomotora dos insetos infectados por *T. rangeli* foi levemente superior durante a escotofase, porém sem diferenças estatísticas significativas. Surpreendentemente, as ninfas infectadas apresentaram um aumento significativo no número médio de movimentos durante a fotofase (\bullet $p < 0.1$, $\ast p < 0.05$, $\ast\ast\ast p < 0.001$). No geral, os insetos infectados se movimentaram 23% a mais do que os não infectados.

A avaliação do número de ninfas ativas (indivíduos que apresentaram pelo menos um evento de atividade por hora) mostrou que os insetos infectados por *T. rangeli* apresentaram atividade significativamente maior, principalmente durante as fases de baixa atividade (Figura 10; Mann-Whitney, $p < 0,05$). Em adição, os insetos infectados ativos apresentaram um número total de movimentos maior do que os não infectados, tanto durante a escotofase, quanto na fotofase (Figura 11; Mann-Whitney, $p < 0,05$ e $p < 0,0005$, respectivamente).

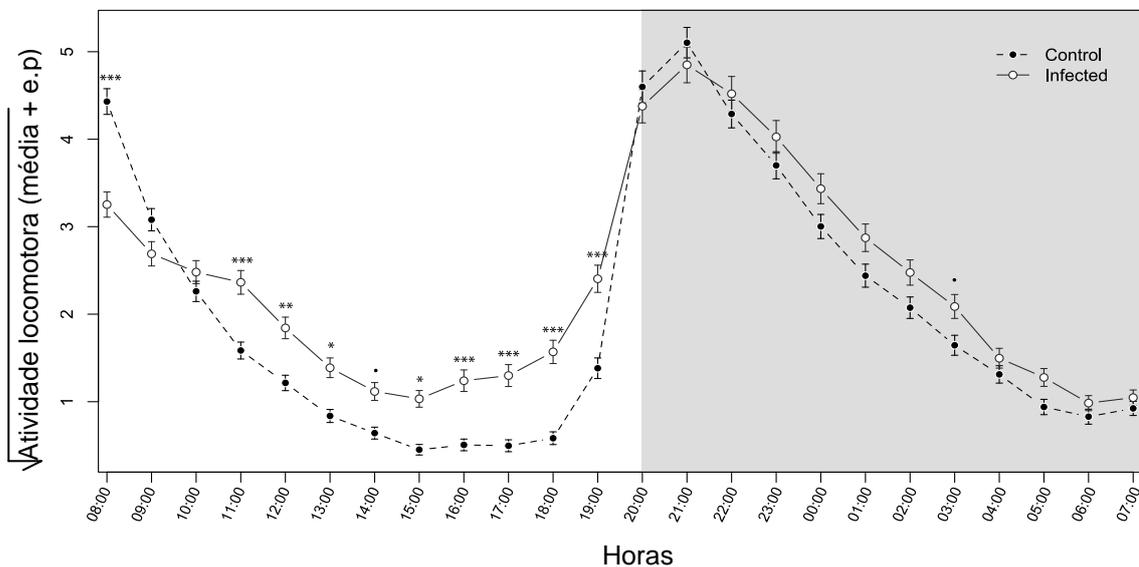


Figura 8: Efeito da infecção por *T. rangeli* sobre o perfil de atividade locomotora de ninfas de *Rhodnius prolixus*. As áreas branca e cinza representam a fotofase e escotofase, respectivamente. Os dados são apresentados como a raiz quadrada da atividade locomotora de seis ensaios ($n = 18$ insetos por tratamento em cada ensaio; \bullet $p < 0,1$, \ast $p < 0,05$, $\ast\ast\ast$ $p < 0,001$).

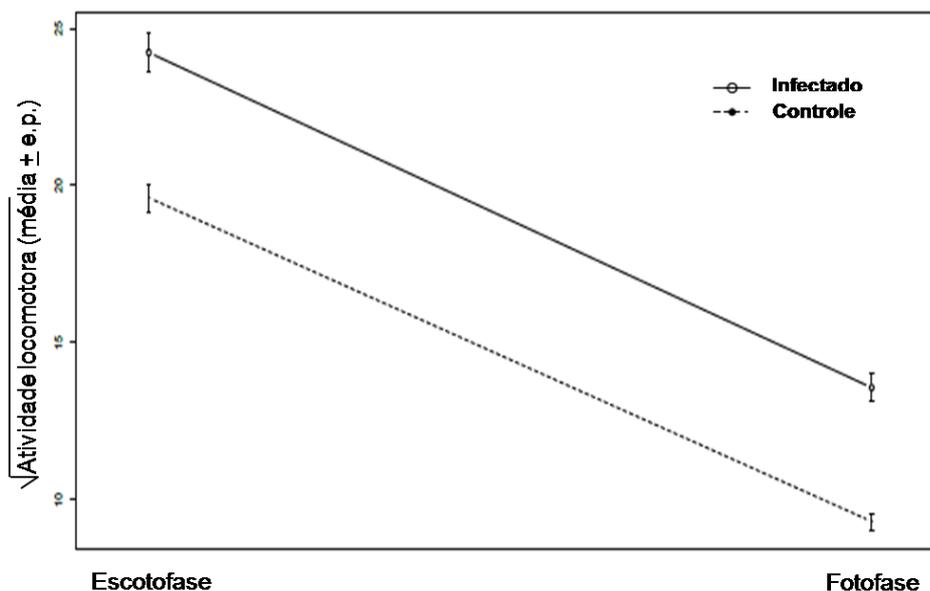


Figura 9: Efeito da infecção por *T. rangeli* sobre a atividade de ninfas de *Rhodnius prolixus*. Os dados apresentados representam a raiz quadrada da atividade locomotora acumulada após seis dias de avaliação e são discriminados entre as fases de escuridão e luz.

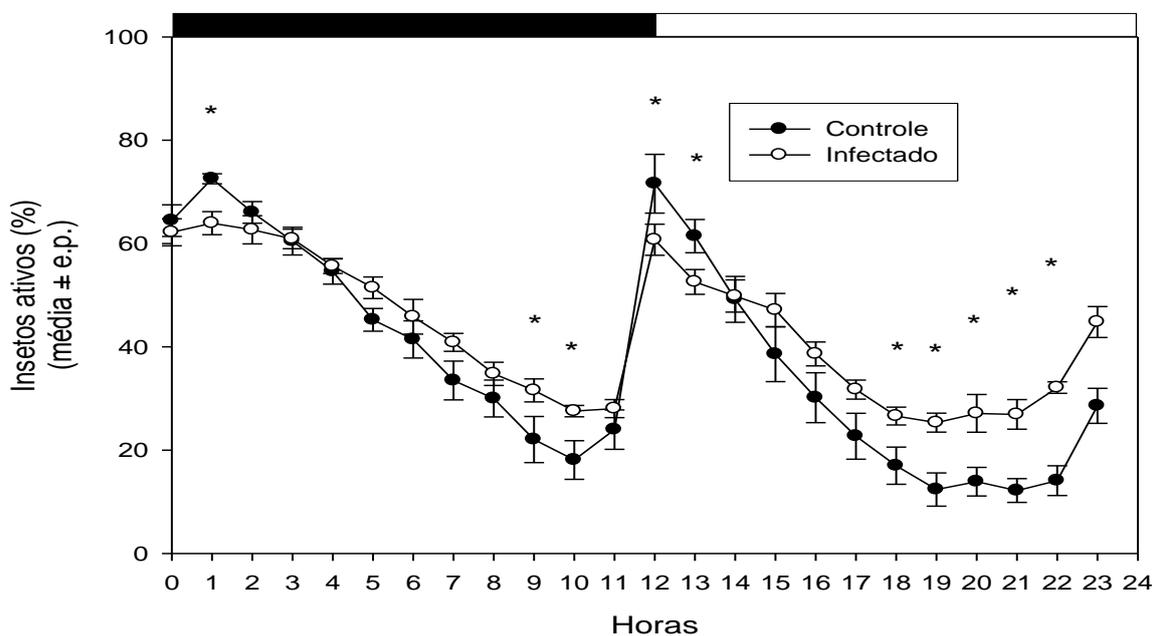


Figura 10: Efeito da infecção por *T. rangeli* na porcentagem de ninfas ativas. As barras horizontais representam a escotofase (preto) e a fotofase (branco). Os dados representam a média de seis ensaios cada um com 18 insetos por tratamento (*Mann-Whitney; $p < 0,05$).

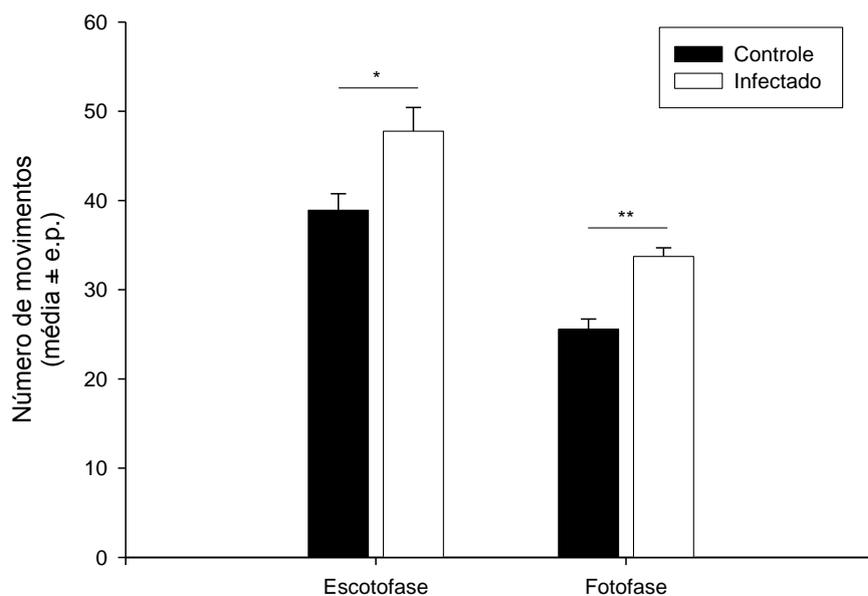


Figura 11: Efeito da infecção por *T. rangeli* no número de movimentos apresentados pelas ninfas ativas. Os dados representados são a média de três ensaios cada um com 18 insetos por tratamento (Mann-Whitney; * $p < 0.03$, ** $p < 0.0005$).

5.2 Uso de abrigos

Uma vez que a atividade locomotora de ninfas de *R. prolixus* foi alterada pela infecção por *T. cruzi* e por *T. rangeli*, sugeriu-se que a alteração observada poderia ter consequências diretas na dinâmica de utilização de abrigos pelos triatomíneos. O efeito da infecção sobre o uso de abrigos, assim como o efeito da presença de um hospedeiro foram avaliados. A dinâmica de entrada nos abrigos durante o período de aclimação foi muito semelhante independentemente da infecção com *T. cruzi* ou *T. rangeli* (Figura 12). Especialmente nas seis primeiras horas após a liberação das ninfas, foi possível perceber uma intensa atividade de entrada e saída do abrigo. Após esse período, a atividade se tornou bastante reduzida, coincidindo com a entrada dos insetos nos abrigos.

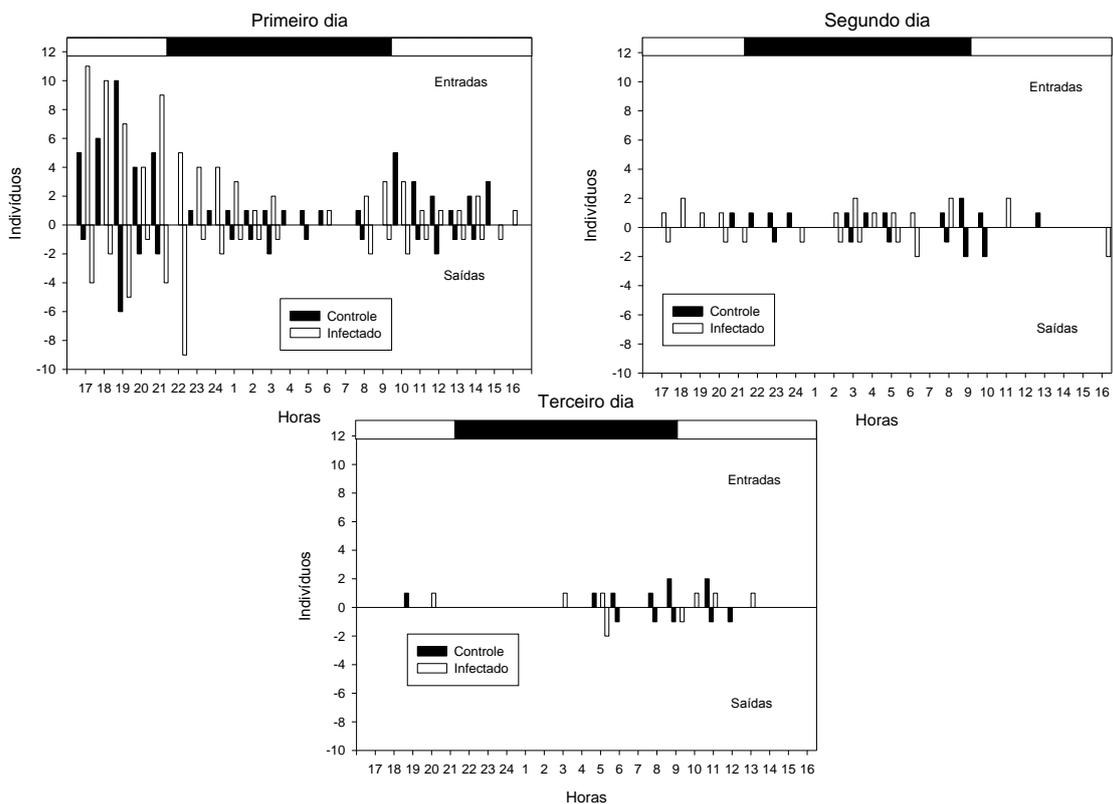


Figura 12: Dinâmica de entradas e saídas de abrigos de ninfas de *Rhodnius prolixus* infectadas ou não por *T. rangeli*. As barras horizontais demarcam as fases de luz (branco) e escuridão (preto).

Decorrido o período de três dias para a aclimação dos insetos, o número de ninfas fora dos abrigos foi contabilizado. A porcentagem de insetos que permaneceram dentro do abrigo após esse intervalo foi de aproximadamente 87% e 92% para o grupo infectado com *T. cruzi* e seu grupo controle, respectivamente (Figura 13A; Qui-quadrado, n.s.).

Durante o intervalo em que o camundongo foi mantido na arena os insetos apresentaram uma atividade de saída e entrada dos abrigos mais intensa do que a observada na ausência do hospedeiro (dados não mostrados). A figura 14 mostra a porcentagem de insetos fora do abrigo ao longo do ensaio com o camundongo. Na presença do hospedeiro houve uma aparente tendência das ninfas infectadas com *T. cruzi* em saírem mais do abrigo em comparação ao grupo controle (figura 14). Essa pequena diferença foi observada das 2:00 às 5:00 horas e não foi estatisticamente significativa.

Por fim, a infecção por *T. cruzi* não pareceu afetar a quantidade de indivíduos que permaneceram na arena após a retirada do hospedeiro, onde cerca de 6% dos

indivíduos de ambos os tratamentos foram encontrados fora dos abrigos (Figura 16A; Qui-quadrado, n.s.).

Diferentemente da infecção por *T. cruzi* que não alterou nenhum dos parâmetros avaliados para o uso de abrigo, a infecção por *T. rangeli* induziu modificações em todos. A quantidade de ninfas infectadas por *T. rangeli* que entraram no abrigo durante o período de aclimação foi significativamente menor do que a de insetos não infectados (Qui-quadrado, $p < 0,0001$). A porcentagem de insetos do grupo controle dentro dos refúgios foi de 82,5%, enquanto a observada para os insetos infectados com *T. rangeli* foi de 64% (Figura 13B).

Adicionalmente, a infecção por *T. rangeli* alterou a dinâmica de entradas e saídas do abrigo na presença do hospedeiro. Uma porcentagem maior de indivíduos infectados foi observado fora do abrigo ao longo do período de exposição do hospedeiro (Figura 15; Qui-quadrado, $p < 0,0001$). Interessantemente, no período entre 2:00 e 7:00 horas, mais de 70% das ninfas infectadas permaneceram expostas na arena, enquanto menos de 40% das ninfas não infectadas estavam fora do abrigo.

Finalmente, decorrido duas horas da retirada do camundongo, uma porcentagem significativamente maior de insetos infectados com *T. rangeli* ainda permanecia fora do abrigo quando comparado com insetos sadios (35% insetos infectados vs 9% insetos não infectados) (Figura 16B, Qui-quadrado; $p < 0,0001$).

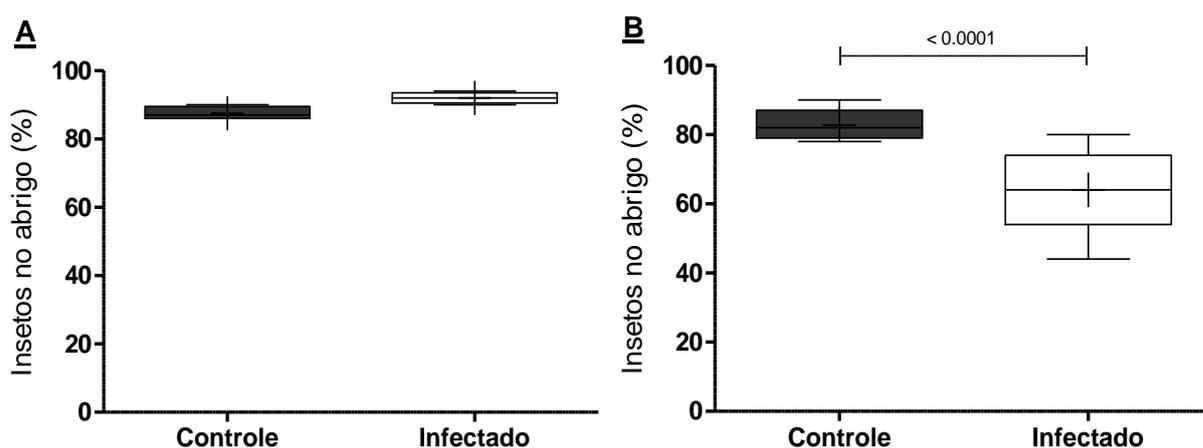


Figura 13: Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* que entram nos abrigos após um período de três dias de aclimação. **A:** efeito da infecção com *T. cruzi* (Qui-quadrado, n.s.). **B:** efeito da infecção com *T. rangeli* (Qui-quadrado, $p < 0,0001$). Os dados representam a mediana (linha

horizontal) e a média (+) da porcentagem de insetos encontrados dentro do abrigo a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (25%-75% □, Máx – Min I).

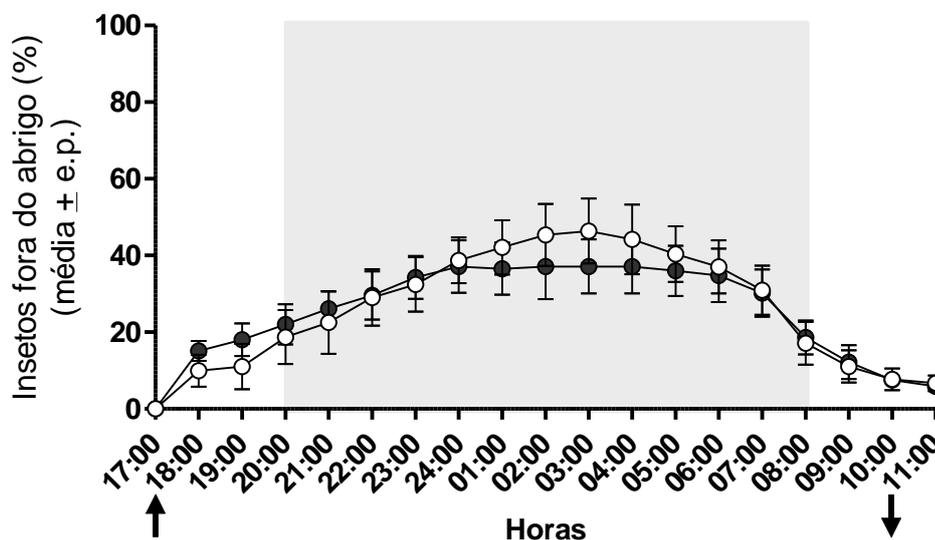


Figura 14: Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre a dinâmica de entradas e saídas de abrigos (número de insetos que saíram menos número de insetos que entraram nos abrigos) de ninfas de *Rhodnius prolixus*. Os círculos brancos representam o balanço entre entradas e saídas de insetos infectados e os pretos correspondem ao de insetos não infectados. As áreas brancas e cinza representam a fotofase e escotofase, respectivamente, enquanto as setas indicam a apresentação (↑) e retirada (↓) do hospedeiro. Os dados representam a média \pm erro padrão da porcentagem de insetos fora do abrigo a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (Qui-quadrado, n.s.).

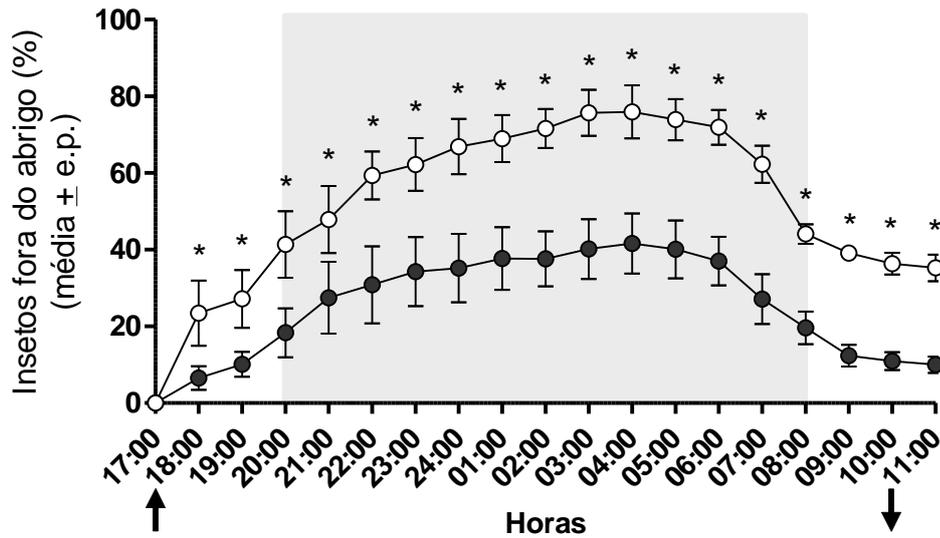


Figura 15: Efeito da infecção por *T. rangeli* sobre a dinâmica de entradas e saídas de abrigos (número de insetos que saíram menos número de insetos que entraram nos abrigos) de ninfas de *Rhodnius prolixus*. Os círculos brancos representam o balanço entre entradas e saídas de insetos infectados e os pretos correspondem ao de insetos não infectados. As áreas brancas e cinza representam a fotofase e escotofase, respectivamente, enquanto as setas indicam a apresentação (↑) e retirada (↓) do hospedeiro. Os dados representam a média ± erro padrão da porcentagem de insetos fora do abrigo a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (Qui-quadrado, * $p < 0,001$).

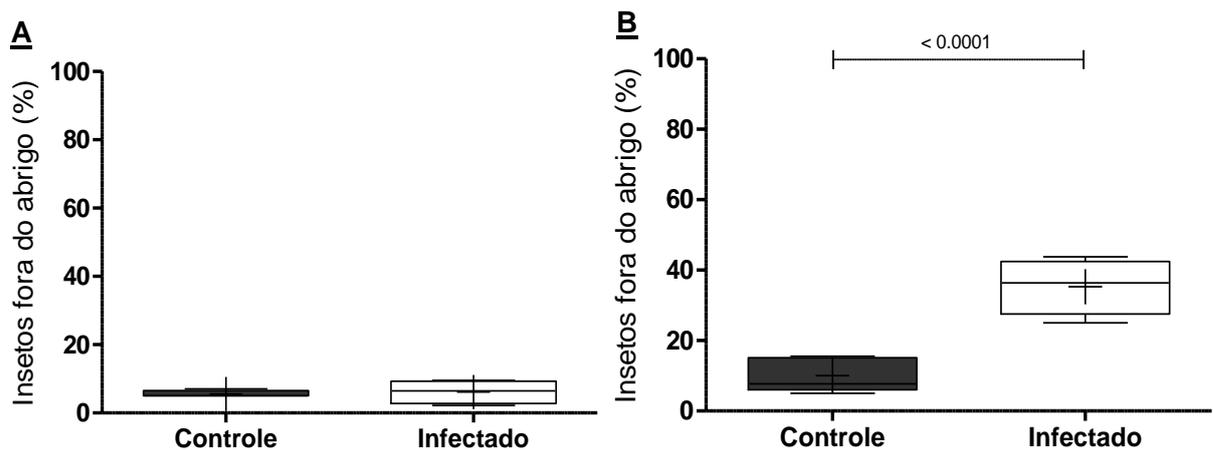


Figura 16: Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* que permaneceram fora do abrigo duas horas após a retirada do hospedeiro. **A:** efeito da infecção por *T. cruzi* (Qui-quadrado, n.s.). **B:** efeito da infecção por *T. rangeli* (Qui-quadrado, $p < 0,0001$). Os dados representam a mediana

(linha horizontal) e a média (+) da porcentagem de insetos encontrados fora do abrigo a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (25%-75% □, Máx - Min I).

5.3 Predação.

De maneira semelhante ao observado no ensaio anterior, após o período de aclimação a porcentagem de insetos dentro do abrigo foi de 94% para o grupo controle e 92% para o grupo infectado com *T. cruzi* (Figura 17A; Qui-quadrado, n.s.).

Surpreendentemente, a infecção por este parasito induziu um aumento significativo na porcentagem de insetos predados (Figura 18A). Assim, enquanto aproximadamente 36% dos insetos infectados por *T. cruzi* foram predados pelo camundongo, apenas 19% dos insetos não infectados sofreram predação (Figura 18A; Qui-quadrado, $p=0,0003$). A razão de chance do teste foi de 1,6. Ou seja, a probabilidade de predação entre os insetos infectados por *T. cruzi* foi 1,6 vezes a chance de predação de um inseto não infectado.

Após o registro dos dados de predação foi avaliada a porcentagem de insetos sobreviventes que conseguiram se alimentar e realizar a muda. Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os tratamentos no número de insetos que conseguiu se alimentar (Figura 19; Qui-quadrado, n.s.). As porcentagens de sucesso na alimentação foram de 19 e 18% para o grupo não infectado e infectado, respectivamente. Dos insetos que se alimentaram, 68 e 53% dos indivíduos não infectados e infectados, respectivamente, conseguiram completar a muda para o estágio adulto (Figura 19; Qui-quadrado, n.s.).

De acordo com o experimento anterior, nos ensaios com *T. rangeli*, uma proporção significativamente menor dos insetos infectados entrou nos refúgios (68%), em comparação a proporção de insetos não infectados (86%) (Figura 17B; Qui-quadrado; $p=0,0007$). Além disso, os insetos infectados por *T. rangeli* foram mais predados que aqueles do grupo controle (Figura 18B; Qui-quadrado, $p<0,0001$). As taxas de predação no grupo infectado foram de 48%, enquanto que no grupo não infectado esses valores foram de 24%. A probabilidade de predação entre os insetos infectados por *T. rangeli* foi 2,7 vezes a chance de ser predado entre os insetos sadios.

Ao final do ensaio, 11% das ninfas infectadas por *T. rangeli* sobreviventes conseguiram se alimentar, enquanto o mesmo foi observado em 21% das ninfas não

infectadas (Figura 20; Qui-quadrado, $p=0,014$). Dos insetos infectados que se alimentaram 40% completou a muda e chegou ao estágio adulto, enquanto este valor foi de 58,5% no grupo dos insetos sadios (Figura 20; Qui-quadrado, n.s).

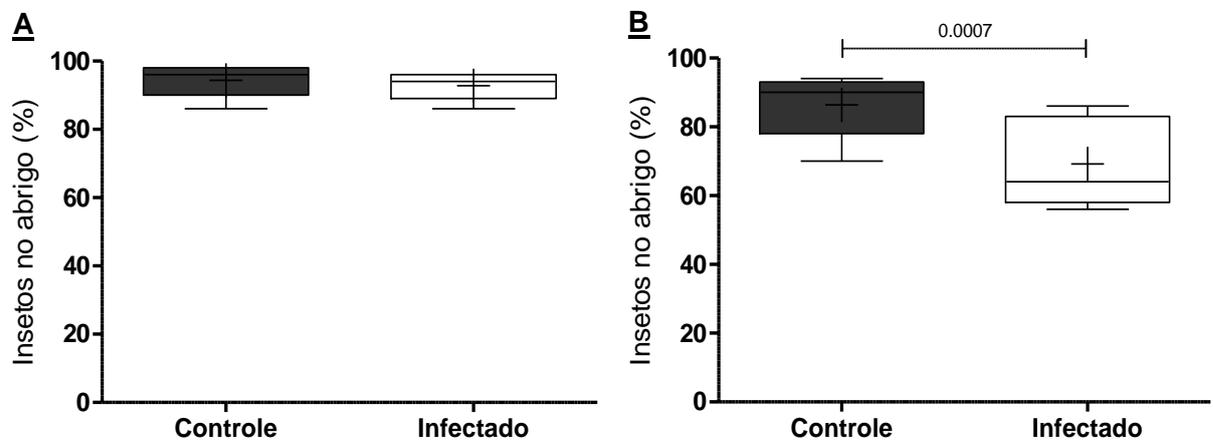


Figura 17: Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* que entraram nos abrigos após um período de três dias de aclimação. **A:** efeito da infecção com *T. cruzi* (Qui-quadrado; n.s.). **B:** efeito da infecção com *T. rangeli* (Qui-quadrado; $p=0,0007$). Os dados representam a mediana (linha horizontal) e a média (+) da porcentagem de insetos encontrados dentro do abrigo a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (25%-75% □, Máx - Min I).

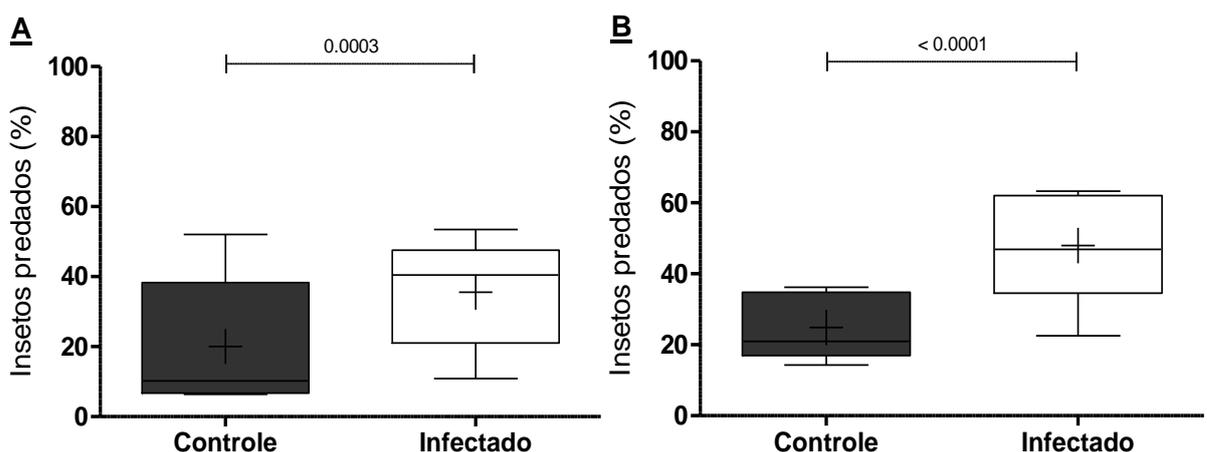


Figura 18: Efeito da infecção por tripanosomas sobre a porcentagem de ninfas de *R. prolixus* predadas. **A:** efeito da infecção com *T. cruzi* (Qui-quadrado; $p=0.0003$). **B:** efeito da infecção com *T. rangeli* (Qui-quadrado; $p<0.0001$). Os dados representam a mediana (linha horizontal) e a média (+) da porcentagem de insetos

predados a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (25%-75% □, Máx - Min I).

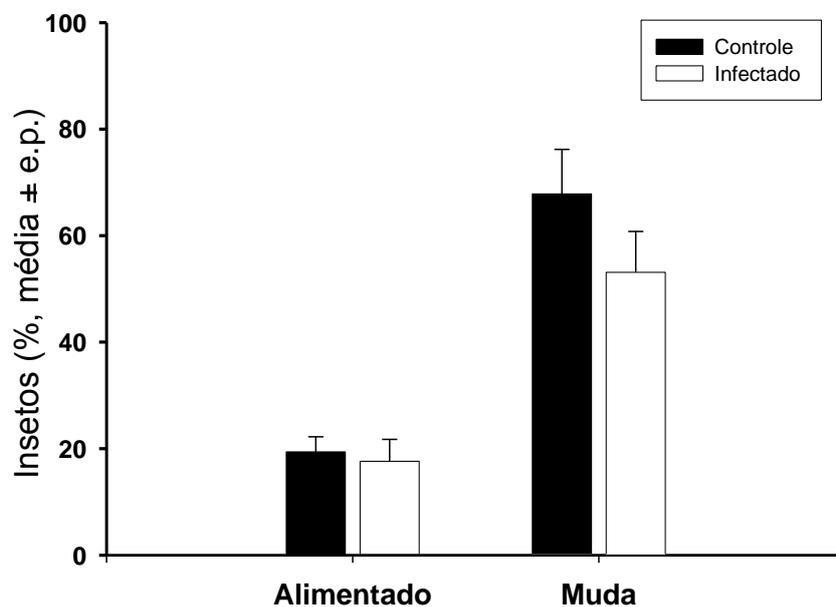


Figura 19: Efeito da infecção por *T. cruzi* sobre a porcentagem de insetos sobreviventes que conseguiram se alimentar e realizar a muda. Os dados representam a média da porcentagem de insetos predados a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (Qui-quadrado, n.s.).

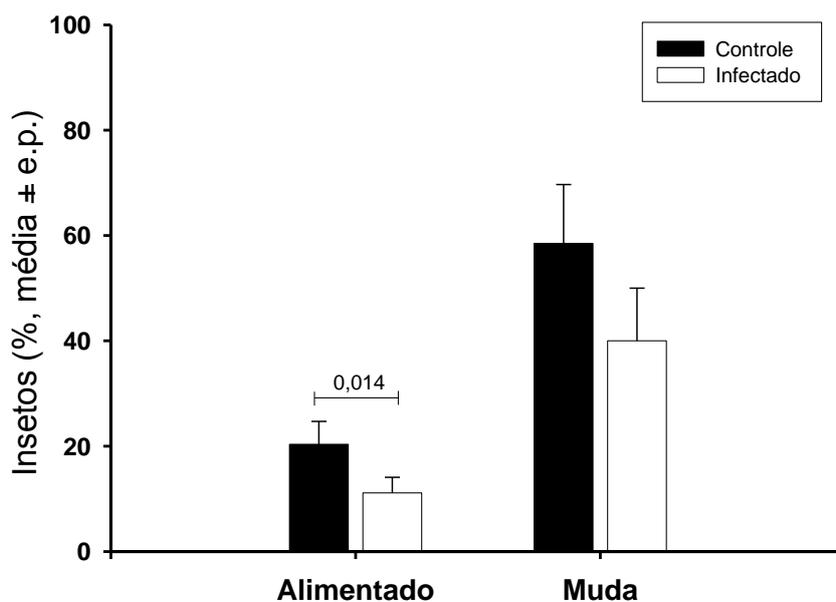


Figura 20: Avaliação do efeito potencial da infecção por *T. rangeli* sobre a porcentagem de insetos sobreviventes alimentados e que realizaram a muda. Os

dados representam a média da porcentagem de insetos predados a partir de cinco ensaios para ambos os tratamentos (Qui-quadrado, $p=0.014$).

5.4 Infecção Oral.

O objetivo deste experimento foi determinar se a ingestão de ninfas infectadas com *T. rangeli* promoveria a infecção dos camundongos. Do total de 10 camundongos utilizados, 8 comeram todas as ninfas infectadas disponíveis e os 2 restantes comeram somente duas delas.

Todos os xenodiagnósticos realizados nos camundongos mediante a análise de um total de 217 triatomíneos examinados (23 morreram ou não se alimentaram e foram perdidos) foram negativos.

Finalmente, 30 dias após a alimentação dos triatomíneos, o sangue de cada camundongo foi utilizado para realização de uma hemocultura, sendo que em 100% dos casos o resultado foi negativo para presença de parasitos.

6 DISCUSSÃO

Infecções parasitárias podem induzir alterações comportamentais nos hospedeiros e conseqüentemente aumentar a probabilidade de transmissão dos parasitos. O padrão bimodal de atividade locomotora e a tendência de uso de esconderijos são características comportamentais relacionadas à busca de fontes alimentares e proteção nos triatomíneos (Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998). Como consequência, a alteração destes padrões comportamentais modificaria a distribuição espacial dos insetos e as janelas temporais de interação com seus hospedeiros. Todos os grupos de *R. prolixus* estudados no presente trabalho apresentaram o padrão bimodal de atividade locomotora característico dos triatomíneos, com picos que antecederam o início da escotofase e fotofase, independentemente da infecção por tripanosoma (Núñez, 1982; Lazzari, 1992; Barrozo *et al.*, 2004). Surpreendentemente, as ninfas infectadas com *T. cruzi* mostraram uma diminuição da atividade locomotora durante grande parte da escotofase e, especialmente, durante o pico da primeira metade da fase escura. Esse intervalo representa o período de maior atividade dos triatomíneos, pois é o momento no qual acontece a busca de alimento e parceiros sexuais (Núñez, 1982; Lorenzo & Lazzari, 1998; Barrozo *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2008; Pontes *et al.*, 2014). Durante o dia, após o pico inicial da fotofase, os insetos praticamente não apresentaram movimentos, independentemente do seu *status* de infecção com *T. cruzi*.

A alteração dos padrões de atividade do hospedeiro é um efeito frequentemente descrito nas relações parasitárias (Thomas *et al.*, 2010). Em alguns casos, a redução da atividade locomotora parece ser causada pela destruição de tecidos, como quando a microfilária *Brugia pahangi* invade os músculos de voo do mosquito *Aedes aegypti* (Rowland & Lindsay, 1986). De maneira semelhante, o grilo *Gryllus integer* apresenta um declínio na intensidade da sua locomoção quando seu parasitóide, a mosca *Ormia ochracea*, está próximo de emergir (Adamo *et al.*, 1995). Este efeito é consequência da destruição de grande parte dos músculos do grilo pelas larvas do parasitóide. No entanto, o *T. cruzi* não invade a cavidade celomática dos seus vetores e seu desenvolvimento é restrito ao trato intestinal. Em adição, lesões dos tecidos dos triatomíneos não têm sido relatadas durante a infecção por *T. cruzi* (Kollien *et al.*, 1998), indicando que é pouco provável que a diminuição da atividade observada no nosso estudo seja consequência de prejuízos diretos.

Recentemente, foi demonstrado que *T. cruzi* pode ser patogênico para *R. prolixus* dependendo da temperatura ambiental e condições nutricionais em que os insetos são mantidos (Fellet *et al.*, 2014). Trabalhos anteriores sugerem que *T. cruzi* compete por nutrientes com seu vetor, uma vez que insetos infectados apresentaram uma redução na resistência ao jejum além de aumentarem sua susceptibilidade a outros fatores de estresse (Schaub, 1989; Kollien & Schaub, 1998). Além disso, *T. infestans* infectados por *T. cruzi* necessitam de mais sangue para realizar a muda do que insetos saudáveis, provavelmente para compensar a perda de nutrientes utilizados pelos tripanosomas (Juarez, 1970). Uma diminuição significativa do peso das gônadas como consequência da redução do estado nutricional induzida pela infecção por *T. cruzi* foi observada em *Mepraia spinolai* (Botto-Mahan *et al.*, 2008). Adicionalmente, *M. spinolai* infectados pelo mesmo parasito foram capazes de detectar hospedeiros e se orientar em direção a eles quase duas vezes mais rápido do que insetos não infectados (Botto-Mahan *et al.*, 2006). Em nossos experimentos, a atividade locomotora dos insetos foi avaliada na ausência de pistas do hospedeiro. Portanto, é possível que a diminuição da atividade locomotora observada para os insetos infectados com *T. cruzi* possa representar uma estratégia dedicada a evitar a perda de recursos nutricionais, já reduzidos, na ausência de sinais que confirmem a presença de um hospedeiro. Essa diminuição da atividade na ausência do hospedeiro pode ter a finalidade de estender a sobrevivência do inseto. Um comportamento semelhante foi sugerido para *Cimex lectularius* na ausência de pistas do hospedeiro (Romero *et al.*, 2010).

Diferentemente das alterações promovidas pela infecção por *T. cruzi*, nos insetos infectados por *T. rangeli* houve um aumento da atividade locomotora durante a maior parte da escotofase e, principalmente, durante a fotofase. De fato, aumento da atividade locomotora induzido por infecções já foram relatados. Recentemente foi demonstrado que *A. aegypti* infectados pelo vírus da Dengue, são mais ativos do que mosquitos não infectados (Lima-Camara *et al.*, 2011). Essa maior atividade começou a ser observada quatro horas antes da fotofase e foi mais intensa durante a transição luz/escuridão. Da mesma forma, a infecção por *Wolbachia pipientis* aumenta a atividade diurna de machos e fêmeas da mesma espécie de mosquito (Evans *et al.*, 2009). Outro modelo clássico de estudo de insetos, a mariposa da seda *Bombyx mori*, apresentou elevadas taxas de atividade locomotora quando infectado por baculovírus (Kamita *et al.*, 2005). Em fases tardias da infecção este patógeno promove danos na cutícula larval dos insetos. O dano cuticular em

conjunto com o aumento da atividade locomotora resulta no vazamento de hemolinfa infectada e, conseqüentemente, na transmissão do vírus (Ohkawa *et al.*, 1994).

Nossos resultados indicam que tanto a infecção por *T. cruzi* quanto por *T. rangeli* induzem alterações nos padrões de atividade locomotora de ninfas de *R. prolixus*. Tais modificações parecem importantes na compreensão da dinâmica de utilização de abrigos pelos triatomíneos. Conforme esperado, as ninfas de *R. prolixus* apresentaram intensa atividade de entrada e saída dos abrigos após sua liberação na arena experimental, independentemente da infecção parasitária. Essa maior movimentação durante as primeiras horas do ensaio provavelmente está relacionada ao estresse sofrido pelos insetos a partir da sua manipulação e/ou liberação em um ambiente desconhecido. Nos dias subsequentes a atividade decaiu, uma vez que os triatomíneos buscaram a proteção dos refúgios. Ao final do período de aclimatação, nos ensaios que avaliaram a infecção por *T. cruzi*, não foram observadas diferenças significativas quanto a porcentagem de insetos dentro do abrigo, quando comparados os tratamentos. A alta proporção de ninfas dentro do abrigo, próxima a 90%, reforça o quanto esse comportamento é marcante em triatomíneos e demonstra a importância dos refúgios para o grupo. Os triatomíneos são insetos noturnos, encontrados durante o dia agregados e em acinese (Lorenzo & Lazzari, 1998). Tais comportamentos são altamente adaptativos, pois permitem que os insetos diminuam sua exposição a predadores vertebrados, que eventualmente são fonte de sua dieta sanguínea. Assim, em um contexto natural, uma maior exposição durante o dia pode potencialmente aumentar a mortalidade de insetos por ação de seus predadores. Portanto, o abrigo é um recurso fundamental na sobrevivência dos triatomíneos, pois, além de fornecer condições de temperatura e umidade mais amenas e estáveis (Lorenzo & Lazzari, 1999), também oferece proteção.

Já está descrito na literatura que uma vez que *R. prolixus* se encontre dentro de refúgios, a saída de indivíduos em situação de ausência de pistas do hospedeiro raramente é observada (Ferreira, 2009). Nos experimentos do presente estudo, quando um hospedeiro foi apresentado na arena se observou uma elevada atividade de entradas e saídas dos abrigos. A atividade durou quase todo o período noturno e foi semelhante entre insetos infectados e não infectados por *T. cruzi*, sendo mantida mesmo que os insetos estivessem impedidos de se alimentar. Entretanto, duas horas após a retirada do hospedeiro, já durante a fotofase, a maioria dos indivíduos retornou ao abrigo. Essa intensa atividade aparentemente contraria os dados obtidos

nos ensaios do actômetro, onde foi observada uma redução na atividade locomotora dos insetos justamente durante o período relacionado com busca de hospedeiro. É importante ressaltar que a diferença marcante entre os dois ensaios foi a apresentação de pistas do hospedeiro. Ferreira (2009) avaliou a saída de abrigos de ninfas de *R. prolixus* na presença de camundongos que ficavam suspensos na arena e emitiam pistas de odores e temperatura. No referido desenho experimental foi observado um aumento na proporção de insetos que deixavam o abrigo, porém, inferior ao mostrado no presente estudo, provavelmente em decorrência da falta de estímulos mecânicos vibratórios em decorrência da suspensão dos hospedeiros. Este fato, somado aos resultados obtidos nos ensaios do actômetro, reforça a ideia da importância da presença de pistas robustas do hospedeiro para o disparo de comportamentos que induzam a saída dos abrigos pelos insetos. Mais ainda, se insetos infectados por *T. cruzi* têm um déficit nutricional em decorrência da infecção, a presença de pistas concretas indicando um potencial hospedeiro parecem ser cruciais para desencadear o comportamento de saída do refúgio.

Diferentemente do observado na infecção por *T. cruzi*, a infecção por *T. rangeli* induziu alterações em praticamente todos os parâmetros avaliados na dinâmica de utilização de abrigos por *R. prolixus*. Primeiramente, a presença do parasito induziu um aumento na proporção de ninfas que não entraram nos abrigos durante o período de aclimação. Conseqüentemente, um maior número de insetos permaneceu exposto na arena o que representa a alteração de um comportamento de grande relevância para os triatomíneos. Da mesma forma, na presença de pistas do hospedeiro, uma porcentagem significativamente maior de insetos infectados deixou os abrigos em comparação com os insetos não infectados. Finalmente, uma proporção maior de insetos infectados pelo *T. rangeli* permaneceu fora do abrigo após a retirada do camundongo. Vale lembrar que os insetos infectados por *T. rangeli* apresentaram níveis de atividade locomotora maiores do que insetos não infectados mesmo na ausência de pistas do hospedeiro, como mostrado nos ensaios de actômetro. Os efeitos observados poderiam, em parte, estar relacionados a uma já demonstrada redução da fototaxia negativa dos insetos, induzida pela presença deste parasito (Ferreira, 2011). Este conjunto de resultados indica uma tendência de insetos infectados por *T. rangeli* de permanecerem mais expostos fora dos abrigos, o que poderia representar uma alteração comportamental prejudicial para a sobrevivência dos mesmos. Cabe destacar, que as avaliações da porcentagem de insetos fora do abrigo após o período de aclimação e após a retirada do

camundongo foram realizadas durante a fotofase. Portanto, em um contexto natural o aumento observado potencialmente deixaria os insetos mais susceptíveis a ação de predadores.

Os ensaios de uso de abrigo mostraram como a infecção por tripanosomas pode afetar a exposição de insetos infectados a potenciais predadores. Restava ainda avaliar se essas alterações levariam a um aumento nas taxas de predação sofrida por insetos infectados quando em contato com hospedeiros vertebrados. Interessantemente, independente do comportamento apresentado por insetos infectados por *T. cruzi* ou *T. rangeli*, as taxas de predação registradas foram significativamente elevadas nos insetos infectados. No caso de insetos infectados por *T. cruzi*, apesar de nenhum parâmetro relacionado com o uso de abrigos ter sido alterado pela infecção, as taxas de predação sofridas pelos insetos infectados por este parasita foram significativamente aumentadas. Conforme demonstrado por Juarez (1970), ninfas de *T. infestans* infectadas com *T. cruzi* necessitam ingerir mais sangue e precisam de mais repastos para realizarem a muda para o estágio adulto. Adicionalmente, Botto-Mahan e colaboradores (2006) demonstraram que insetos infectados picam 45% mais que os insetos não infectados durante a alimentação em camundongos anestesiados. Sendo assim, é possível que o aumento observado nas taxas de predação de insetos infectados por *T. cruzi* seja consequência de um maior tempo de contato com o hospedeiro vertebrado, no caso de o inseto ter que ingerir volumes maiores de sangue. Da mesma forma, se forem necessárias mais picadas, ou se o inseto for mais insistente em decorrência de um maior déficit nutricional, maior será a chance de o mesmo ser percebido e predado pelo hospedeiro. De fato, se considera que quanto menor for o tempo de repasto de um triatomíneo, maiores serão suas chances de sobreviver, uma vez que o risco de predação pelo hospedeiro é em grande parte medido pela duração da interação (Schofield, 1994). Entretanto, apesar de muitos autores terem avaliado a duração do repasto sanguíneo em várias espécies de triatomíneo (Guarneri *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009; Loza-Murguía & Noireau, 2010; Barreto-Santana *et al.*, 2011), até o momento não foi avaliado se este período é alterado quando o inseto está infectado por *T. cruzi*.

Nossos resultados do estudo da interação triatomíneos-tripanosomatídeos são inéditos ao demonstrarem que a infecção por *T. cruzi* promove aumentos nas taxas de predação e sugerem fortemente que esta alteração poderá induzir um aumento nas taxas de transmissão do parasito. Nossa hipótese é sustentada por

diversos trabalhos que demonstraram a transmissão de *T. cruzi* pela via oral (Brumpt, 1913b; Nattan-Larrier, 1921; Kofoid & Donat, 1933b; Cardoso, 1933; Hoft *et al.*, 1996; Rabinovich *et al.*, 2001; Coffield *et al.*, 2013).

Aumentos nas taxas de predação também foram induzidos pela infecção com *T. rangeli*. Conforme demonstrado, ninfas infectadas foram 2.7 vezes mais propensas a serem predadas do que ninfas não infectadas. De fato, o aumento do número de insetos que permaneceram fora do abrigo na presença de sinais do hospedeiro, sugeria que a alteração comportamental promoveria efeitos negativos para o inseto. Diferentemente do *T. cruzi* que tem seu desenvolvimento no vetor restrito ao trato intestinal, o *T. rangeli* pode atravessar o epitélio intestinal do inseto e se desenvolver na hemocele e glândulas salivares, o que resulta em populações massivas de parasitos (D'Alessandro, 1976). Essa infecção generalizada pode comprometer consideravelmente o estado geral do inseto e, provavelmente, afetar a busca de fontes alimentares. Infecções com uma massiva população de parasitos espalhados por todo o corpo do inseto certamente promoverão um aumento significativo no déficit nutricional do mesmo. De acordo com a hipótese levantada para o comportamento expresso por insetos infectados por *T. cruzi*, os insetos infectados por *T. rangeli* deveriam, pelo menos na ausência de pistas de hospedeiro, apresentar níveis diminuídos de atividade locomotora, o que não foi observado no presente estudo. Como citado anteriormente, a infecção por *T. rangeli* promove uma série de efeitos que reduzem as populações de simbiossitos intestinais (Brecher & Wigglesworth, 1944; Lake & Friend, 1967; Eichler & Schaub, 1998), afetam aspectos reprodutivos (Fellet *et al.*, 2014), aumentam a mortalidade (Grewal 1957; Tobie 1965), prolongam os períodos intermuda (Ferreira *et al.*, 2010), além de induzirem um aumento na quantidade de lipídeos na hemolinfa dos insetos (Ferreira *et al.*, 2010). Sendo assim, é possível que as alterações comportamentais observadas em insetos infectados por *T. rangeli* sejam o resultado de uma série de fatores e interações complexas que levam a um aumento generalizado nos seus níveis de atividade e de exposição à luz. Dados não publicados de nosso grupo mostraram que a infecção por *T. rangeli* altera a expressão de diferentes genes, dentre eles, do gene *foraging* (codifica para uma proteína quinase dependente de cGMP) que tem sido relacionado com a regulação da atividade locomotora associada ao forrageamento em diferentes grupos de insetos (ver revisão Kaun & Sokolowski, 2009; Reaume & Sokolowski, 2011).

No final dos ensaios que avaliaram as taxas de predação de insetos infectados, nós avaliamos a proporção de indivíduos sobreviventes que conseguiram se alimentar e realizar a muda. Apesar dos insetos infectados por *T. cruzi* terem sido mais predados do que os não infectados, a proporção de indivíduos que teve sucesso na alimentação não foi diferente entre os tratamentos, sugerindo que o sucesso na obtenção de alimento não parece ser afetado pela infecção. No caso de insetos infectados por *T. rangeli*, além de serem mais predados, uma menor proporção de indivíduos sobreviventes conseguiu se alimentar. Esses resultados reforçam a ideia de que o processo de ingestão sanguínea de *R. prolixus* pode ser alterado pela infecção por *T. rangeli* (Garcia *et al.*, 1994).

Um aumento nas taxas de predação de vetores infectados por parasitos capazes de serem transmitidos por via oral certamente seria vantajoso para o parasito, aumentando suas taxas de transmissão. Como citado anteriormente, a transmissão oral de *T. cruzi* tem sido amplamente estudada (Brumpt, 1913b; Nattan-Larrier, 1921; Kofoid & Donat, 1933b; Cardoso, 1933; Hoft *et al.*, 1996; Rabinovich *et al.*, 2001, Coffield *et al.*, 2013) e os recentes surtos de infecção humana comprovam a importância dessa via (Tatto *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009; Souza-Lima *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a transmissão do parasito através das fezes apresenta uma eficiência muito baixa sendo estimado que são necessários 900-4000 contatos para que ocorra uma infecção (Nouvellet *et al.*, 2013). Sendo assim, os resultados do presente estudo sugerem que a alteração comportamental que eleva as taxas de predação em insetos infectados por *T. cruzi* traria benefícios para o parasito, aumentando suas chances de transmissão. No caso de *T. rangeli*, a transmissão oral não foi demonstrada até o presente momento e nossos dados parecem confirmar os dados da literatura (embora outros modelos animais devam ser testados). Entretanto, é importante ressaltar que a transmissão de *T. rangeli* pela picada é altamente eficiente. Ferreira (2013) estimou que aproximadamente 50.000 tripomastigotas metacíclicos são liberados durante a alimentação sanguínea de uma ninfa infectada. No mesmo trabalho, a autora mostrou que cerca de 90% dos camundongos que serviram como fonte de alimentação para uma única ninfa infectada foram capazes de adquirir o parasito e transmiti-lo para novos insetos. Sendo assim, no caso do *T. rangeli* a picada já seria suficiente para garantir a transmissão do parasito e um aumento na motivação do inseto para procurar o hospedeiro aumentaria suas chances de transmissão. Apesar de diferentes, as estratégias de ambos os parasitos parecem garantir a ampla

distribuição dos mesmos dentro do continente americano (Miles *et al.*, 1983; Steindel *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1993; Ramirez *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Reisenman *et al.*, 2012).

Apesar de grande parte das alterações promovidas por parasitos nos seus hospedeiros serem um subproduto da infecção, diversos autores sugerem que algumas delas sejam consequência de uma manipulação pelos parasitos (Poulin, 1995; Moore, 1995; Hatcher *et al.*, 2006). Considera-se que para que os efeitos induzidos por um parasito sejam considerados manipulação é necessário comprovar que as causas das alterações observadas no hospedeiro sejam específicas do parasito; que o efeito aumenta a transmissão do parasito; e que as moléculas responsáveis pelas mudanças induzidas no hospedeiro sejam produzidas pelo parasito (Hurd, 2003). Os resultados do presente estudo não são suficientes para indicar que *T. cruzi* e *T. rangeli* manipulem processos fisiológicos para favorecer sua transmissão. Contudo, os dados que mostram níveis mais altos de predação de insetos infectados sugerem que possa haver algum tipo de manipulação por parte dos parasitos. Como mencionado anteriormente, outros estudos do nosso grupo mostrando que a presença do parasito altera a expressão de genes envolvidos no controle do comportamento sustentam essa ideia. Estes resultados certamente apresentam uma nova perspectiva no estudo das interações entre tripanosomas e seus vetores, tornando fundamental a compreensão dos mecanismos que regulam a interação para um melhor entendimento do processo.

7 CONCLUSÕES

Atividade locomotora:

- Insetos infectados por *T. cruzi* apresentaram atividade locomotora reduzida durante a primeira metade da escotofase, momento no qual os triatomíneos procuram seus hospedeiros;
- Insetos infectados por *T. rangeli* apresentaram um aumento na atividade locomotora, que foi mais pronunciado durante a fase do dia em que os triatomíneos normalmente permanecem em abrigos.

Uso de abrigos:

- O padrão de uso de abrigos de *R. prolixus* não foi afetados pela infecção por *T. cruzi*;
- Por sua vez, a infecção por *T. rangeli* alterou o padrão de uso de abrigos nesses insetos, induzindo sua exposição em ambientes abertos;

Predação:

- As duas espécies de tripanosomas promoveram aumentos significativos nas taxas de predação sofridas por *R. prolixus*.
- Somente a infecção por *T. rangeli* afetou negativamente a porcentagem de insetos que se alimentaram durante o contato com o hospedeiro vertebrado.

Infecção Oral:

- A via oral se mostrou incapaz de promover a infecção de camundongos por *Trypanosoma rangeli*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamo SA, Robert D, Hoy RR. Effects of a tachinid parasitoid, *Ormia ochracea*, on the behavior and reproduction of its male and female field cricket hosts (*Gryllus spp*). J Insect Physiol 1995; 41: 269-277.
- Andersen JF, Gudderra NP, Francischetti IM, Ribeiro JM. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. Arch Insect Biochem Physiol 2005; 58(2): 97-105.
- Alekseev AN. Group and individual behaviour of infected and noninfected arthropods – vectors of diseases. Zoological Institute 1992; 1-15.
- Alekseev AN. 1996. Tick-pathogen interactions: behaviour of infected and uninfected ticks (Ixodidae). In: Mitchell et al. (Eds.) Proc. Acarology IX, Ohio Biological Survey, Columbus 1996; 1: 113-115.
- Almeida CE, Cilense M, Nascimento JD, de Oliveira J, Camargo LMA, de Carvalho EOC, Ferreira Filho JC, Mendonça VJ, Pinto MC, Gardim S, Rocha CS, da Rosa JA. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. Zootaxa 2012; 3478: 62–76.
- Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. 1. Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. In Canning Parasitological Topics, Special Publication of the Society of Protozoologists 1981; 1: 19-25.
- Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII--Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79(2): 249-55.
- Añez N, Velandia J, Rodríguez AM. Estudios sobre *T. rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuestas a las reinfecciones en los mamíferos. Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80: 149-153.
- Añez, N., Nieves, E., Cazorla, D. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82: 1-6.
- Barreto-Santana D, Starling J, Gurgel-Gonçalves R, Cuba CA. [Comparative biology and feeding behavior of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius robustus* (Triatominae) under laboratory conditions]. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44(4): 490-5.
- Barrozo RB, Schilman PE, Minoli SA, Lazzari CR. Daily rhythms in disease-vector insects. Biol Rhythm 2004; 35: 79–92.
- Basombrio MA, Gorla D, Catala S, Segura MA, Mora MC, Gomez L, et al. Number of vector bites determining the infection of guinea pigs with *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91(4): 421-3.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. `lme4`: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-7. 2014. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.

Bodin A, Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol 2008; 54(9): 1343-8.

Botto-Mahan C, Cattan PE, Medel R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. Acta Trop 2006; 98(3): 219-23.

Botto-Mahan C, Sepulveda M, Vidal M, Acuna-Retamar M, Ortiz S, Solari A. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. Acta Trop 2008; 105(2): 166-9.

Brecher G, Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology 1944; 35: 220-224.

Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1963; 5: 220-224.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol 1973; 27: 347-82.

Brumpt E. Evolution de *Trypanosoma lewisi*, *dvtoni*, *ndbiwsi*, *blanchardi*, chez les puces et les punaises. Transmission par les déjections. Comparaisons avec *T. cruzi*. Bull. Soc. Pathol. Exotique 1913b; 8: 167-172.

Canals M, Solis R, Valderas J, Ehrenfeld M, Cattan PE. Preliminary studies on temperature selection and activity cycles of *Triatoma infestans* and *T. spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), Chilean vectors of Chagas' disease. J Med Entomol 1997; 34(1): 11-7.

Cardoso FA. Sur le mécanisme de la transmission de la maladie de Chagas. Ann Parasit Hum Comp 1933; 16: 341-349.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1909; 1: 159-218.

Coffield DJ, Jr., Spagnuolo AM, Shillor M, Mema E, Pell B, Pruzinsky A, et al. A model for Chagas disease with oral and congenital transmission. PLoS One 2013; 8(6): e67267.

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 278-279.

D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, in: Lumsden, WHR e Evans DA (eds.), Bio Kinetoplastid 1976; 1: 328-403.

D'Alessandro-Bacigalupo A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*, in: Kleir JP e Baker J (eds.), Parasitic Protozoa 1992; 2: 1-54.

- D'Alessandro A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*, in: Gilles HM, Protozoal Diseases 1999; 398-412.
- de Rosario-Martinez H. phia: Post-Hoc Interaction Analysis. R package version 0.1-5. 2013. <http://CRAN.R-project.org/package=phia>.
- Dias JCP. Mecanismos de transmissão. In: Andrade Z, Brener Z. *Trypanosoma Cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan 1979; 89-151.
- Di Luciano VS. Orientation of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) to environmental temperatures. J Med Entomol 1983; 20: 446-454.
- Dorn PL, Flores J, Brahney B, Gutierrez A, Rosales R, Rodas A, Monroy C. Comparison of polymerase chain reaction on fresh tissue samples and fecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 503-505.
- Eichler S, Schaub GA. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 1998; 44(2): 131-40.
- Eichler S, Schaub GA. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. Exp Parasitol 2002; 100(1): 17-27.
- Evans O, Caragata EP, McMeniman CJ, Woolfit M, Green DC, Williams CR, et al. Increased locomotory activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. J Exp Biol 2009; 212: 1436-1441.
- Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. PLoS One 2014; 9(8): e105255.
- Ferreira RA. Aspectos relacionados à escolha do sítio de alimentação em *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Heteroptera: Reduviidae) e o papel do sentido térmico neste comportamento. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG): Centro de Pesquisas René Rachou, Brasil; 2009.
- Ferreira LL, Lorenzo MG, Elliot SL, Guarneri AA. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. J Inverteb Pathol 2010; 105: 91-97.
- Ferreira LL, Lorenzo MG, Guarneri AA. Leaving the dark side: infection by *Trypanosoma rangeli* weakens the negative phototaxis of *Rhodnius prolixus* nymphs. XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. XXXVIII Annual Meeting on basic research in Chagas' Disease; 2011 Set 19-21; Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2011. p 215.
- Ferreira LL, Guarneri AA, Pereira MH. Hospedeiros vertebrados são eficientes reservatórios para a transmissão do *Trypanosoma rangeli* ao inseto vetor. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil; 2013.

Ferreira RC, Lorenzo MG, Guarneri AA. Avaliação da colonização de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no intestino de *Rhodnius prolixus*. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte (MG): Centro de Pesquisas René Rachou, Brasil; 2014.

Figueiras AN, Lazzari CR. Temporal change of the aggregation response in *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(6): 889-92.

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

Garcia, ES, Mello, CB, Azambuja, P, Ribeiro, JM. *Rhodnius prolixus*: Salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp Parasitol 1994; 78: 287-293.

Grewal MS. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. Exp. Parasitol 1957; 6: 123-130.

Groot H, Renjifo S, Uribe C. Nota preliminar sobre inoculación a un voluntario humano con *Trypanosoma* sp. (ariari). Ann Soc Biol Bog 1950; 4: 99-103.

Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. J Insect Physiol 2000; 46(7): 1121-7.

Guarneri, A.A., Lazzari, C., Diotaiuti, L., Lorenzo, M. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. Physiol. Entomol 2002; 27: 142-147.

Guarneri, A.A., Lazzari, C., Xavier, A.A.P., Diotaiuti, L., Lorenzo, M. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. Physiol. Entomol 2003; 28: 185-191.

Guerenstein PG, Lazzari CR. Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood. Acta Trop 2009; 110(2-3): 148-58.

Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – An Updated Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 435-442.

Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma AR, Abad-Franch F, Carranza JC, et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev Inst Med Trop 2004; 46(6): 323-30.

Gurgel-Gonçalves R, Galvao C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. Journal of Tropical Medicine 2012; 2012: 1-15.

Hatcher MJ, Dick JT, Dunn AM. How parasites affect interactions between competitors and predators. Ecol Lett 2006; 9(11): 1253-71.

- Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun* 1996; 64(9): 3800-10.
- Hudson L, Guhl F, Sanchez N, Bridge D, Jaramillo CA, Young A. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 1988; 96: 449-460.
- Hurd H. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu. Rev. Entomol* 2003; 48: 141–61.
- Juarez E. [Behavior of *Triatoma infestans* under various laboratory conditions]. *Rev Saúde Pública* 1970; 4(2): 147-66.
- Jurberg J, Cunha V, Cailleaux S, Raigorodski R, Lima MS, Rocha DS, Moreira FFF. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Pan-Amaz Saúde* 2013; 4(1): 43-56.
- Kamita SG, Nagasaka K, Chua JW, Shimada T, Mita K, Kobayashi M, et al. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(7): 2584-9.
- Kaun KR, Sokolowski MB. cGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. *Genome* 2009; 52(1): 1-7.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH. Interrupted feeding of vectors. *Parasitol Today* 1990; 6: 188-189.
- Kofoed CA, Donat F. The experimental transfer of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected *Triatoma protracta* to mammals in California. *Univ California Pud Zool* 1933; 26: 257-259.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of starvation. *J Euk Microbiol* 1998; 45: 59–63.
- Kollien AH, Schmidt J, Schaub GA. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 1998; 70(2): 127-41.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol* 2000; 16(9): 381-7.
- Lake P, Friend WG. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Proc Entomol Soc Ontario* 1967; 98: 53-57.
- Latorre-Estivalis JM, Omondi AB, Lorenzo MG. Plasticity in the molecular bases of olfaction in a Chagas disease vector. XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul; 2013 Out 22-26; Florianópolis, Santa Catarina. Brasil; 2013.

- Lazzari CR, Núñez JA. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 1989; 35: 525-529.
- Lazzari CR. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Bull. Entomol. Res 1991; 81: 273-276.
- Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 1992; 38: 895-903
- Levine ND, Corlissa JO, Cox EEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM. A newly revised classification of the Protozoa. J Protozoology 1994; 27: 37-58
- Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenco-de-Oliveira R, Sorgine MH, et al. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. PLoS One 2011; 6(3): e17690.
- Lorenzo MG, Lazzari CR. The spatial pattern of defaecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. J. Insect Physiol 1996; 42: 903-907.
- Lorenzo, MG, Lazzari, CR. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Acta Tropica 1998; 70: 163-170.
- Lorenzo MG, Lazzari CR. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. Acta Trop 1999; 72(3): 241-9.
- Lorenzo MG, Guarneri AA, Pires HH, Diotaiuti L, Lazzari CR. Microclimatic properties of the *Triatoma brasiliensis* habitat. Cad Saúde Pública 2000; 16 Suppl 2: 69-74.
- Loza-Murguía M, Noireau F. Vectorial capacity of *Triatoma guasayana* (Wygodzinsky & Abalos) (Hemiptera: Reduviidae) compared with two other species of epidemic importance. Neotrop Entomol 2010; 39(5): 799-809.
- Marinkelle CJ. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* stal in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). J Med Entomol 1968; 5(4): 497-9.
- Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naif RD, de Souza AA, Pova MM, Lima JAN, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg 1983; 32(6): 1251–1259.
- Molyneux DH, Jefferies D. Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. Parasitology 1986; 92(3): 721-36.
- Moore J. The behavior of parasitized animals. BioScience 1995; 45(2): 89-96
- Mota T, Lorenzo MG. Lack of segregation between two species of Chagas disease vectors. Am J Trop Med Hyg 2012; 87(1): 109-16.

Nattan-Larrier L. Infections a Trypanosomes et voies de penetrations des virus. Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique 1921; 14: 537-542.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis 2009; 15(4): 653-5.

Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S. The Improbable Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Human: The Missing Link in the Dynamics and Control of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7(11): e2505

Núñez J, Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). Bulletin of Entomological Research 1982; 72: 253-262.

Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Sarquis O, Lima MM. Feeding and defecation patterns of *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae), a triatomine native to an area endemic for Chagas disease in the state of Ceara, Brazil. Am J Trop Med Hyg 2009; 81(4): 651-5.

Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Gomes TF, Sarquis O, Sposina R, Lima MM. Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(8): 1057-60.

Ohkawa T, Majima K, Maeda S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. J Virol. 1994; 68(10): 6619-25.

Paim RM, Pereira MH, Araujo RN, Gontijo NF, Guarneri AA. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). Insect Biochem Mol Biol 2013; 43(3): 229-36.

Paredes CH, Paredes R. Un caso de infección humana por *Trypanosoma rangeli*. Rev Fac Med Bog 1949; 18: 343-375.

Pontes G, Zacharias CA, Manrique G, Lorenzo MG. Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation. Medical and Veterinary Entomology 2014; 28: 257–263.

Poulin R. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. Int J Parasitol 1995; 25(12):1371-83.

Rabinovich JE, Wisnivesky-Colli C, Solarz ND, Gurtler RE. Probability of transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. Bull World Health Organ 1990; 68(6): 737-46.

Rabinovich J, Schweigmann N, Yohai V, Wisnivesky-Colli C. Probability of *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae). Am J Trop Med Hyg 2001; 65(2): 125-30.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, et al. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop* 2002; 84(3): 189-98.

Ramirez-Sierra MJ, Herrera-Aguilar M, Gourbiere S, Dumonteil E. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health* 2010; 15(1): 77-86.

Reaume CJ, Sokolowski MB. Conservation of gene function in behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366(1574): 2100-10.

Reisenman CE, Insausti TC, Lazzari CR. Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Exp Biol* 2002; 205(2): 201-10.

Reisenman CE, Savary W, Cowles J, Gregory TL, Hildebrand JG. The distribution and abundance of triatomine insects, potential vectors of Chagas Disease, in a metropolitan area in southern Arizona, United States. *J Med Entomol* 2012; 49(6): 1254-61.

Ribeiro JM, Andersen J, Silva-Neto MA, Pham VM, Garfield MK, Valenzuela JG. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2004; 34(1): 61-79.

Roca M, Lazzari CR. Effects of the relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Higr preference and eclosion success. *J. Insect Physiol* 1994; 40: 901-907.

Romero A, Potter MF, Haynes KF. Circadian rhythm of spontaneous locomotor activity in the bed bug, *Cimex lectularius* L. *J Insect Physiol* 2010; 56(11): 1516-22.

Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(5): 742-9.

Rowland MW, Lindsay SW. The circadian flight activity of *Aedes aegypti* parasitized with the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Physiol Entomol* 1986; 11: 325-334.

Sandoval CM, Gutierrez R, Luna S, Amaya M, Esteban L, Ariza H, et al. High density of *Rhodnius prolixus* in a rural house in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(4): 372-3.

Schaub GA 1988a. Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 74: 593-594.

Schaub GA 1988b. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene 82: 94-97.

Schaub GA. Auswirkungen von Parasiten auf das Verhalten ihrer Wirte. Biol. Z. 1989a; 19: 196–202.

Schaub GA, Lösch P. Parasite/host-interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. Ann Trop Med Parasitol 1989; 83(3): 215-23.

Schaub GA. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. Exp Parasitol 1989b; 68(3): 260-73.

Schaub GA. The effects of trypanosomatids on insects. Adv Parasitol 1992; 31: 255-319.

Schofield CJ. Triatominae: Biology and Control. West Sussex: Eurocommunica Publications 1994; 76.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Tropica 2009; 110(2): 88-100.

Souza-Lima Rde C, Barbosa M, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento Ada S, Ferreira JM, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46(4): 510-4.

Steindel M, Carvalho PCJ, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro RR, Romanha AJ. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyss dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86: 73–79.

Steindel M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina [tese de doutorado]. Belo Horizonte(MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.

Sullivan JJ, Steurer F, Benavides G, Tarleton RL, Eberhard ML, Landry S. Trypanosomes and microfilariae in feral owl and squirrel monkeys maintained in research colonies. Am J Trop Med Hyg 1993; 49(2): 254-9.

Tatto E, Menezes JA, Kitagawa BY, Freitas DR, Dimech GS, Wada MY. Acute Chagas disease (ACD) outbreak related to sugar cane drunk in Santa Catarina State, south Brasil. In: Abstracts of the 56th Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007 Nov 4–8; Philadelphia. Philadelphia: The Society; 2007. Abstract 997.

Thomas F, Poulin R, Brodeur J. Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. Oikos 2010; 119: 1217-1223.

Tobie EJ. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. J Parasitol 1965; 51(5): 837-41.

Valente SAS, Valente VC, Neto HF. Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94 Suppl 1: 395-398.

Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa Cesar M, dos Santos MP, Miranda CO, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103(3): 291-7.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. Acta Trop 2009; 110(2-3): 137-47.

Wigglesworth VB. The functions of corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). Quarterly J Microscop Science 1936; 79: 91-121.

WHO, World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [online] Marc 2015 [capturado 11 Março 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

Zeledón R. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Chagas Disease Vectors 1987; 2: 59-75.