

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização da atividade locomotora e perfis de expressão gênica em
*Rhodnius prolixus***

por

Newmar Pinto Marlière

Belo Horizonte

2019

TESE

DCS-IRR

N.P. MARLIÈRE

2019

NEWMAR PINTO MARLIÉRE

**Caracterização da atividade locomotora e perfis de expressão gênica em
*Rhodnius prolixus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Alessandra Aparecida Guarneri

Coorientação: Marcelo Gustavo Lorenzo

Belo Horizonte

2019

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

M347c Marlière, Newmar Pinto.
2019

Caracterização da atividade locomotora e perfis de expressão gênica em *Rhodnius prolixus* / Newmar Pinto Marlière. – Belo Horizonte, 2019.

XV, 87 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 63 - 71

Tese (Doutorado) – Tese 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 2. Triatomíneos 3. Atividade locomotora 4. Expressão gênica I. Título II. Guarnieri, Alessandra Aparecida (Orientação). III. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA 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^a. Alessandra Aparecida Guarneri (Presidente)

Prof. Dr^a. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Prof. Dr. Theo Rolla Paula Mota

Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'anna

Prof. Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira

Tese defendida e aprovada em: 13/12/2019

Dedico este trabalho à
minha família

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.

À Dra. Rafaela Paim que além de ser uma grande amiga, foi de fundamental importância nos ensinamentos sobre as metodologias de RNAi.

À Dr. Liléia, pelo exemplo e carinho.

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

À Lu, meu amor, minha esposa e agora mãe do nosso neném. Por ser 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 Nathalia e ao Iago, que são muito mais que amigos, são anjos sempre dispostos a ajudar, sempre presentes e me guiando em cada passo.

À Laila, que se tornou uma amiga indispensável, por toda ajuda no final do desenvolvimento desta tese e por compartilhar suas músicas jurássicas.

À Raissa, companheira de doutorado, com quem compartilhei angústias e dificuldades e que foi indispensável em cada momento ao longo destes cinco anos.

À Katharina, que veio de tão longe para se tornar tão próxima. Obrigado pelas preocupações, por seu cuidado e carinho.

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

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

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 Silvinha, primeira orientadora e por ser 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, padrinhos com os quais muito aprendi e pude compartilhar durante toda essa caminhada.

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 Jessica, Camila, Carlota, Eduardo, Flávia, Rita, Rafaela, enfim a todos.

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, conselhos e por não duvidar do meu trabalho e capacidade.

Aos meus familiares, representados pelos meus avós José e Marli, exemplos de fé e perseverança. Que saudade eu sinto de vocês meus amores!!!

Agradeço as Instituições que apoiaram diretamente esse trabalho:

Instituto René Rachou - FIOCRUZ/MG

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

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

RESUMO

Rhodnius prolixus é o principal vetor da doença de Chagas, que afeta vários milhões de pessoas na América Latina. Esses insetos noturnos passam a maior parte de sua atividade locomotora durante as primeiras horas da escotofase em busca de hospedeiros adequados. Neste estudo, utilizamos análises multivariadas para caracterizar perfis de atividade locomotiva não orientada apresentadas pelas ninfas de 5^o estágio ao longo do ciclo diário. Investigamos se o sexo e a expressão do gene forrageador (*Rpfor*) poderiam estar envolvidos na modulação dessa característica comportamental. Adicionalmente, silenciámos os genes *foraging* e o *neuropeptídeo F* (*RpNPF*) e avaliamos o seu efeito sobre a atividade locomotora, a dinâmica de forrageamento de indivíduos em jejum e parâmetros nutricionais de *R. prolixus*. A análise da RDA detectou indivíduos com características distintas em relação ao seu perfil locomotor. Além de uma grande variação na intensidade locomotora, descobrimos que uma proporção das ninfas andava durante intervalos diários incomuns. Os perfis de atividade locomotora foram afetados principalmente pela atividade total das ninfas. Esses efeitos promovidos pela atividade cumulativa foram, por sua vez, influenciados pelo sexo das ninfas. O sexo e a expressão de *Rpfor* tiveram uma influência significativa nos perfis, bem como nos níveis de atividade total. Quando silenciado, o gene *Rpfor* promoveu uma redução generalizada na atividade locomotora e um aumento no forrageamento das ninfas em jejum. Nenhum destes parâmetros foram alterados nos insetos silenciados para o gene *RpNPF*. Contraditoriamente, apenas os insetos silenciados para *RpNPF* apresentaram alterações nas taxas de ingestão de sangue e a quantidade de açúcar na hemolinfa. Os presentes resultados mostram que a variabilidade interindividual é mascarada quando o número médio de movimentos é usado como único parâmetro para descrever perfis locomotores. Além disso, nosso conjunto de dados revela efeitos específicos do sexo nos padrões de locomoção dos triatomíneos imaturos, aparentemente modulados pela expressão diferencial do gene *Rpfor*. E apresenta indícios da participação do gene *Rpfor* nos comportamentos relacionados a busca por alimento em ninfas *R. prolixus*. As sutis alterações observadas nos parâmetros nutricionais revelam a necessidade de investigação aprofundada para atribuir o real impacto dos genes estudados no metabolismo dos vetores da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*; Atividade locomotora; Expressão gênica, gene *Foraging*; Doença de Chagas

ABSTRACT

The triatomine bug *Rhodnius prolixus* is a main vector of Chagas disease, which affects several million people in Latin-America. These nocturnal insects spend most of their locomotory activity during the first hours of the scotophase searching for suitable hosts. In this study we used multivariate analysis to characterize non-oriented locomotory activity profiles presented by 5th instar nymphs along the daily cycle. We investigated whether sex and the expression of the *foraging* (*Rpfor*) gene could be involved in the modulation of this behavioral trait. In addition, we silenced the foraging genes and *neuropeptide F* (*RpNPF*) and evaluated their effect on *R. prolixus* locomotor activity, foraging dynamics and nutritional parameters. RDA analysis detected individuals with distinct characteristics regarding their locomotory profile. In addition to a great variation in locomotory intensity, we found that a proportion of nymphs walked during unusual daily intervals. The locomotory activity profiles were mostly affected by the cumulative activity expressed by the nymphs. These effects promoted by cumulative activity were in turn influenced by the sex of the nymphs. Sex and the *Rpfor* expression had a significant influence on the profiles, as well as the levels of total activity. When silenced, the *Rpfor* gene promoted a generalized reduction in locomotor activity and an increase in foraging of starved nymphs. None of these parameters were altered in the silenced insects for the *RpNPF* gene. Contradictorily, only insects silenced for *RpNPF* showed changes in blood intake rates and hemolymph sugar content. The present results show that interindividual variability is masked when the mean number of movements is used as a sole parameter to describe locomotory profiles. In addition, our dataset reveals sex-specific effects on the locomotion patterns of immature triatomines, which are apparently modulated by the differential expression of the *Rpfor* gene. And it presents evidences of the participation of the *Rpfor* gene in the context of food search in *R. prolixus* nymphs. Subtle changes observed in nutritional parameters reveal the need for in-depth investigation to attribute the real impact of the genes studied on Chagas disease vectors metabolism.

Keywords: *Rhodnius prolixus*; Locomotory activity; Gene expression; *Foraging* gene; Chagas disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Ciclo evolutivo <i>Rhodnius prolixus</i>	17
Figura 2. Representação esquemática do actômetro.	24
Figura 3. Expressão relativa do gene <i>Rpfor</i> em diferentes condições fisiológicas	25
Figura 4.Oscilação da atividade locomotora não orientada de <i>Rhodnius prolixus</i> ...	30
Figura 5.Desenho esquemático da avaliação do comportamento de forrageamento	31
Figura 6.Porcentagem de movimentos por hora realizados por ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i>	34
Figura 7. <i>Cluster</i> hierárquicos dos perfis de atividade locomotora	35
Figura 8.RDA da atividade locomotora total durante 24 horas	37
Figura 9.Exemplos de perfis de atividade individual	38
Figura 10.RDA considerando efeitos do sexo e da expressão de <i>Rpfor</i> (n=65)	40
Figura 11.RDA considerando efeito biológico (n=175)	41
Figura 12.Expressão relativa de <i>Rpfor</i> em machos e fêmeas.....	41
Figura 13. Expressão relativa de <i>Rpfor</i> no cérebro de insetos controle e silenciados (5 e 10 µg)	44
Figura 14. Expressão relativa de <i>Rpfor</i> no cérebro de insetos silenciados (dsFOR)	45
Figura 15. Expressão relativa de <i>Rpfor</i> no corpo gorduroso de insetos silenciados (dsFOR)	46
Figura 16. Expressão relativa de <i>RpNPF</i> no cérebro de insetos silenciados (dsNPF)	47
Figura 17A.Efeito do silenciamento de <i>Rpfor</i> na expressão de <i>RpNPF</i>	48
Figura 17B.Efeito do silenciamento de <i>RpNPF</i> na expressão de <i>Rfor</i>	48
Figura 18.Efeito do silenciamento de <i>Rpfor</i> na atividade locomotora de <i>R. prolixus</i>	49
Figura 19. Efeito do silenciamento de <i>RpNPF</i> na atividade locomotora de <i>R. prolixus</i>	50
Figura 20.Efeito do silenciamento no comportamento de forrageamento	51
Figura 21.Taxa de ingestão de sangue de ninfas silenciadas.....	51
Figura 22.Quantidade de triglicérides no corpo gorduroso de ninfas silenciadas ...	52
Figura 23.Quantidade de triglicérides e açúcares totais na hemolinfa de insetos silenciados	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências dos iniciadores; comprimento do amplicon e intron, R ² : coeficiente de correlação; E: eficiência da qPCR.	27
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise multivariada permutacional não paramétrica de variância.....	42
Tabela 2. Análise GLM dos efeitos da expressão de <i>Rpfor</i> e sexo na atividade cumulativa de ninfas de <i>R. prolixus</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amfor - *Apis mellifera foraging*

cDNA - DNA complementar

cGMP/PKG - *Cyclic GMP/protein kinase*

CGs - Corpos Gordurosos

CO₂ - Gás carbônico

DNA - ácido desoxirribonucleico

dsFOR - *double-stranded foraging*

dsKER - *double-stranded keratin*

dsNPF - *double-stranded neuropeptide F*

dNTP - desoxirribonucleotídeo fosfatado

dsRNAs - *double-stranded RNAs*

for - foraging

KER - *keratin*

µg - micrograma

µL - microlitro

mRNA - RNA mensageiro

nm - nanômetro

NPF - neuropeptídeo F

NPY - neuropeptídeo Y

PBS - *phosphate buffered saline*

PKG - proteína quinase G

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

Rpfor - *Rhodnius prolixus foraging*

RpNPF - *Rhodnius prolixus neuropeptide F*

RT - *reverse transcriptase*

RTq-PCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3. METODOLOGIA	23
3.1. Insetos	23
3.2. Registro da atividade locomotora	23
3.3. Extração de RNA e síntese de cDNA	24
3.4. Quantificação da expressão relativa de genes	25
3.5. Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) – síntese e introdução do RNA de fita dupla.....	26
3.6. Quantificação de triglicerídeos no corpo gorduroso e na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> silenciados	27
3.6.1. Corpo gorduroso.....	27
3.6.2. Hemolinfa	28
3.7. Quantificação de açúcares totais na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> silenciados	28
3.8. Ensaio biológico	29
3.8.1. Avaliação de perfis individuais de atividade.....	29
3.8.2. Avaliação <i>in vivo</i> da função do gene <i>foraging</i> através do silenciamento por RNAi.....	30
3.8.2.1. Atividade locomotora não orientada	30
3.8.2.2. Saída do abrigo na presença de pistas do hospedeiro.....	30
3.8.2.3. Comportamento alimentar	32
3.9. Análise estatística.....	32
3.9.1. Cluster hierárquico e análises multivariadas.....	32
3.9.2. Expressão dos genes <i>Rpfor</i> e sua correlação com a atividade locomotora	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Avaliação de perfis individuais de atividade de ninfas de <i>R. prolixus</i>	34
4.2. Avaliação da influência de fatores biológicos na atividade locomotora de <i>R. prolixus</i> ...	38
4.3. Confirmação do silenciamento dos genes <i>Rpfor</i> e <i>RpNPF</i> através da técnica de RNAi	43
4.4. Avaliação <i>in vivo</i> da função do gene <i>foraging</i> através do silenciamento por RNAi.....	48
4.4.1. Atividade locomotora não orientada	48

4.4.2. Saída do abrigo na presença de pistas do hospedeiro	50
4.4.3. Comportamento alimentar	51
4.4.4. Quantidade de triglicerídeos no corpo gorduroso de ninfas em jejum	52
4.4.5. Quantidade de triglicerídeos e açúcares na hemolinfa	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE.....	72

1. INTRODUÇÃO

A procura e a exploração de recursos alimentares (forrageamento) são comportamentos onde os insetos enfrentam o desafio de tomar decisões diante da presença/ausência de informação em seus ambientes. Quando presentes, as informações podem ser difíceis de serem analisadas devido à abundância de estímulos semelhantes advindos de diferentes fontes, que podem ou não ser alvos para a alimentação (Webster & Cardé, 2017). Tais características fazem do forrageamento um processo complexo que envolve uma série de comportamentos altamente adaptativos.

Os componentes comportamentais envolvidos no forrageamento em insetos dependem de suas relações espaciais e janelas temporais com suas fontes alimentares. Insetos que se alimentam de forma intermitente precisam modular sua atividade locomotora para maximizar o encontro com sua fonte de alimentação e minimizar os riscos associados à sua realização (Dood, 1995). Impulsionado pela fome, o inseto inicia a locomoção não orientada com o intuito de encontrar estímulos advindos de uma fonte potencial. Já é bastante conhecido que a atividade locomotora de insetos muda de acordo com o seu estado nutricional aumentando a chance de o inseto em jejum fazer contato com o alimento. Essas mudanças foram demonstradas tanto no nível geral da atividade não orientada, quanto nos comportamentos que envolvem movimentos usualmente orientados em resposta a fatores físicos e químicos no ambiente. Em diferentes espécies estudadas, o aumento do jejum foi relacionado com um aumento nos níveis da atividade não direcionada (Browne & Evans, 1960; Green, 1964a, 1964b; Bursell, 1957; Brady, 1972). É interessante ressaltar que os níveis de atividade voltam a cair em jejuns muito prolongados (Reynierse, Manning, & Cafferty, 1972; Brady, 1972). Uma vez encontrados, tais estímulos fazem com que o inseto passe a expressar uma atividade locomotora orientada em direção à fonte de alimento. Finalmente, após a alimentação, a atividade locomotora direciona o inseto para longe da fonte alimentar (Browne, 1975).

Além da sua associação com o forrageamento, a atividade locomotora tem sido relacionada a outros contextos como a busca por parceiros sexuais ou por esconderijos apropriados (Franco, Frenkel, & Ceriani, 2018; Guerenstein & Lazzari,

2009; Kaun & Sokolowski, 2009; Kohsaka, Guertin, & Nose, 2017; Takken & Knols, 1999). A locomoção dos insetos pode ser modulada por diversos fatores, como por exemplo, a diversidade genética e fenotípica e a maneira como os indivíduos interagem em uma comunidade (Hughes *et al.*, 2008). Da mesma forma, a locomoção varia com a idade, sexo, relógios circadianos e, como mencionado, o estado nutricional do indivíduo (Cascallares *et al.*, 2018; Pompanon, Fouillet & Bouletreau, 1999). Além disso, condições ambientais como luz, temperatura e umidade relativa também podem afetar os perfis de atividade locomotora de insetos (Buchan & Sohal, 1981; Schou *et al.*, 2013).

Os estudos sobre variabilidade comportamental individual, também conhecida como síndrome comportamental, têm avançado significativamente nos últimos anos. Estes estudos buscam uma melhor compreensão sobre o fato de os animais frequentemente apresentarem características comportamentais marcantes que variam entre os indivíduos do mesmo grupo, populações ou espécie e que são conservadas ao longo do tempo e contextos (Sih, Bell & Johnson, 2004; Bell, 2006; Kralj-Fišer & Schuett, 2014). Tais variações podem ser induzidas por diferentes estímulos endógenos ou exógenos que afetam o padrão comportamental através de mecanismos neurais ou neuroendócrinos internos (Zupanc & Lamprecht, 2000). Recentemente, diferentes estudos têm descrito variações comportamentais individuais em uma ampla gama de invertebrados (ver revisão em Kralj-Fišer & Schuett, 2014). Entretanto, a grande maioria dos trabalhos tem sido realizada com insetos sociais e pouco se sabe sobre tais traços comportamentais e suas consequências adaptativas em insetos não sociais. Apesar do estudo do comportamento de triatomíneos ter avançado de maneira relevante (Lazzari & Nunez, 1989; Lazzari, 1991; Roca *et al.*, 1994; Canals *et al.*, 1997; Lorenzo & Lazzari, 1996, 1998; Guarneri *et al.*, 2002, 2003; Pontes *et al.*, 2014), pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que modulam a expressão, a diversidade intraespecífica e a plasticidade comportamental desses insetos.

Diversos genes têm sido associados à modulação da atividade locomotora em invertebrados, como por exemplo, *foraging* (*for*) e *neuropeptídeo F* (*npf*). O gene *for* foi descrito pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* (de Belle, Hilliker & Sokolowski, 1989) e codifica uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (Ben-Shalar, 2005). Esse gene é altamente conservado, estando presente desde

paramécios até mamíferos e tem sido associado à modulação da busca de alimentos em diferentes insetos (Pereira & Sokolowski, 1993; Ben-Shahar, 2005; Ingram, Oefner & Gordon, 2005; Tobback *et al.*, 2008). Em *D. melanogaster*, dois alelos do gene *for* foram descritos e correlacionados a fenótipos de baixos (*sitter*) e altos (*rover*) níveis de atividade locomotora (Sokolowski, 1980; de Belle, Hilliker & Sokolowski, 1989). Essas diferenças foram relacionadas ao forrageamento e não a locomoção em si, tendo em vista que na ausência de alimento ambos os grupos se deslocavam por distâncias similares (Sokolowski & Hansell, 1992). Nas demais espécies estudadas, as mudanças comportamentais têm sido relacionadas com diferenças na expressão do gene sem que sejam mostradas diferenças alélicas. No gafanhoto do deserto (*Schistocerca gregaria*), por exemplo, os níveis de expressão do gene *for* são menores em indivíduos solitários (com pouca atividade) do que em indivíduos gregários (ativos) (Lucas *et al.*, 2010). Na abelha europeia (*Apis mellifera*), o aumento da expressão do gene *Amfor* (ortólogo do *foraging* dessa espécie) faz com que indivíduos que nutrem as larvas dentro da colmeia se tornem forrageadores (Ben-Shahar *et al.*, 2002). Em outros modelos, apesar da associação entre o forrageamento e a expressão do gene *for* ser conservada, a relação entre a intensidade da locomoção e os níveis de expressão é indireta (menor atividade/menor expressão). Formigas (*Pogonomyrmex barbatus*) e vespas (*Vespula vulgaris*) apresentam níveis menores de expressão do gene *for* em indivíduos forrageadores (geralmente mais ativos) do que indivíduos que tem função no interior das colônias (Ingram, Oefner & Gordon, 2005; Tobback *et al.*, 2008).

O NPF é um peptídeo cerebral que também regula a busca e a ingestão de alimentos (Ament, *et al.*, 2011; Sandman, 1999). Evidências sugerem que o NPF, potencialmente relacionado ao neuropeptídeo Y (NPY) dos mamíferos, pode modular a atividade locomotora (Chung *et al.*, 2017; Heilig *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2003; Wu, *et al.*, 2005a; Wu, Zhao, & Shen, 2005b). Recentemente, Hou e colaboradores (2017) demonstraram que os neuropeptídeos F (*npf1* e *npf2*) desempenham importante papel no controle da plasticidade locomotora do gafanhoto *Locusta migratoria*. Assim como em *S. gregaria*, os indivíduos dessa espécie também podem ser encontrados agregados ou solitários. Gafanhotos gregários apresentam baixos níveis de *npf1* e *npf2* no cérebro, enquanto indivíduos solitários apresentam níveis elevados de ambos neuropeptídeos. O silenciamento de

npf1 e *npf2* pela técnica de interferência por RNA (RNAi) fez com que insetos solitários passassem a expressar o fenótipo gregário. Em *D. melanogaster* foi demonstrado que larvas jovens e forrageiras expressam altos níveis do gene *npf* no cérebro, enquanto as larvas mais velhas que exibem aversão alimentar apresentam baixa expressão do gene (Wu *et al.*, 2003). Os autores mostraram ainda que a perda da sinalização de *npf* em larvas jovens modificadas geneticamente promove o fenótipo de aversão alimentar característico das larvas mais velhas. Por outro lado, a superexpressão de *npf* em larvas velhas prolonga a alimentação. De forma semelhante ao apresentado para *A. mellifera* com relação às diferenças na expressão do gene *for* em abelhas operárias, a expressão do gene *npf* no cérebro destes insetos é menor nas abelhas que nutrem as larvas do que nas forrageiras (Ament *et al.*, 2011). Interessantemente, este neuropeptídeo regula os níveis de oxid nítrico no cérebro, cujo um dos alvos é a via de sinalização de cGMP/PKG (Francis *et al.*, 2010).

Os triatomíneos pertencem à subfamília Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae), onde são reconhecidas 151 espécies vivas e três fósseis, agrupadas em 18 gêneros (Justi & Galvão 2017; Dorn *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Lima-Cordón *et al.*, 2019; Ponair Jr, 2019). São insetos hemimetábolos, predominantemente hematófagos, que necessitam da ingestão de sangue durante todos os cinco estádios ninfais e a fase adulta (Figura 1).

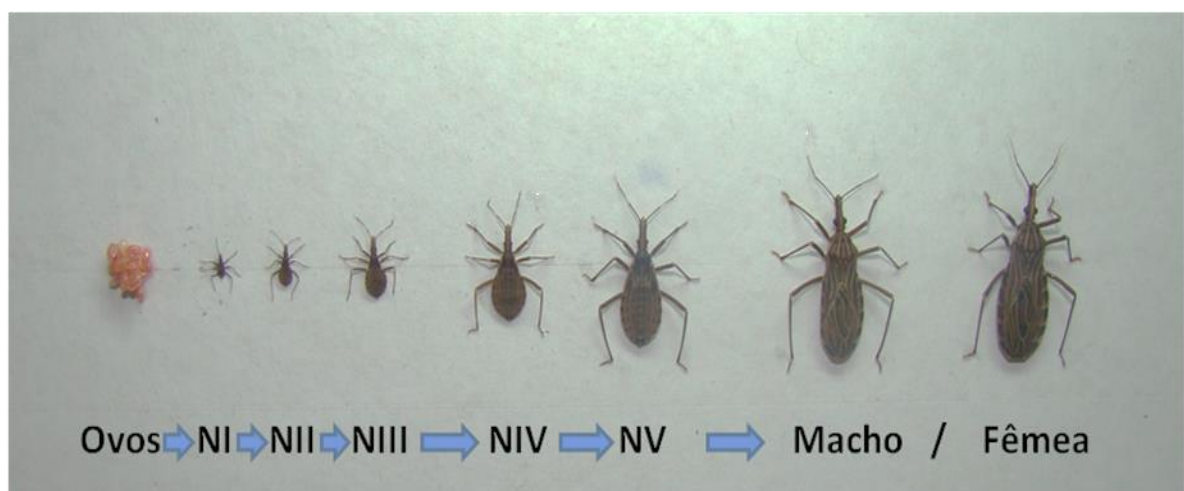


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de *R. prolixus* desde ovo, passando pelos cinco estádios de ninfa (NI a NV) e a fase adulta (Macho e Fêmea).

Além da espoliação sanguínea que causam, os triatomíneos atuam como vetores do *Trypanosoma cruzi*. Este parasito é o agente etiológico da doença de Chagas, uma enfermidade negligenciada que atualmente afeta de 6 a 7 milhões de pessoas, particularmente na América Latina onde a doença é endêmica (WHO, 2019). *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 desta enfermidade (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, Guhl & Schaub G.A. 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).

Os triatomíneos são insetos noturnos que permanecem escondidos em abrigos protegidos durante as horas do dia. A intensa fototaxia negativa que faz com que os triatomíneos busquem abrigos algumas horas antes do início da fotofase é modulada por, dentre outros fatores, relógios circadianos (Reisenman, Lazzari & Giurfa, 1998), mudanças na sensibilidade dos olhos (Reisenman, Insausti & Lazzari, 2002) e a composição espectral da luz (Reisenman & Lazzari, 2006). Uma vez dentro dos abrigos e durante as horas do dia, relógios circadianos reduzem a atividade geral dos insetos que se mantêm em um estado de acinesis (imobilidade) (Lazzari, 1992). O contato físico com o substrato e co-específicos fornece estimulação mecanosensorial que dispara a tigmotaxia, que é um reflexo de imobilidade (Wigglesworth & Gillet 1934). Além disso, fatores derivados da cutícula também contribuem para a agregação e imobilidade dos indivíduos (Figueiras & Lazzari, 1998; Figueiras *et al.*, 2009).

Durante o anoitecer, e em parte devido à diminuição da intensidade da luz, os triatomíneos iniciam um período de locomoção não orientada, o que permite que os mesmos deixem seus abrigos e iniciem a busca por hospedeiros. Os padrões de atividade locomotora não orientada, bem como sua regulação por relógios endógenos, foram bem caracterizados em *Triatoma infestans* (Lazzari, 1992). De maneira geral, os padrões diários exibem um perfil bimodal, com um pico inicial durante as primeiras horas da escotofase e um segundo e mais estreito que precede a fotofase (Guarneri *et al.*, 2003; Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998; Marlière *et*

al., 2015; Pavan *et al.*, 2016). Marca-passos ambientais (*Zeitgebers*) tais como os ciclos diários de luminosidade e temperatura permitem aos indivíduos regularem seu relógio biológico (Lazzari, 1992). A intensidade da atividade depende de fatores como o estado nutricional (Bodin *et al.*, 2008; Guarneri, *et al.*, 2003; Lorenzo & Lazzari, 1998) e maturação (Bodin, Vinauger, & Lazzari, 2009).

Sinais químicos, vapor d'água e calor emitidos por vertebrados e recebidos através de correntes de ar fazem com que os triatomíneos se locomovam de forma orientada para localizar a posição das suas fontes emissoras (Guerenstein & Lazzari, 2009; Lazzari, Pereira, & Lorenzo, 2013). O dióxido de carbono (CO₂) resultante da respiração de hospedeiros vertebrados, por exemplo, constitui um importante sinal para os triatomíneos. A atração dos insetos ao CO₂ é dependente da hora do dia e do estado nutricional dos insetos. Em jejum, *R. prolixus* e *T. infestans* são fortemente atraídos por correntes de ar contendo CO₂ (Núñez, 1982; Taneja & Guerin, 1995; Barrozo, Minoli & Lazzari, 2004). Entretanto, estes indivíduos em jejum somente se orientam em direção a gradientes de CO₂ nas primeiras horas da escotofase (Barrozo, Minoli & Lazzari, 2004). Já os insetos alimentados, são repelidos pelo sinal (Bodin, Vinauger & Lazzari, 2009). Além do CO₂, outros sinais químicos produzidos pelo hospedeiro como nonanal, ácido isobutírico, 1-octen-3-ol e amônia podem também ativar e atrair triatomíneos motivados para se alimentar (Guerenstein & Guerin, 2001; Barrozo & Lazzari, 2004; Taneja & Guerin, 1997). Poucas horas antes do amanhecer, os triatomíneos iniciam o retorno para a segurança do refúgio (Ferreira, Guarneri & Lorenzo, 2019; Lorenzo & Lazzari, 1998). Compostos voláteis (feromônios de agregação), presentes em fezes frescas liberadas por insetos dentro e nas proximidades do abrigo, direcionam esse retorno (Lorenzo & Lazzari, 1996; Vitta *et al.*, 2007).

Como mencionado, a utilização de abrigos é um comportamento marcante e característico em triatomíneos. Sendo assim, para deixarem a segurança dos refúgios o ganho adaptativo resultante no tempo gasto para a aquisição do alimento deve exceder as perdas energéticas que envolvem todo o processo de busca pela fonte alimentar. Isso fica evidente no comportamento expresso por *R. prolixus*, onde poucos indivíduos deixam o abrigo na ausência de pistas de hospedeiros, independentemente do seu estado de jejum (Ferreira, Guarneri & Lorenzo, 2019). Aparentemente, é necessário um conjunto robusto de sinais para induzir a saída desses insetos, já que uma diferença importante na proporção de indivíduos fora do

abrigo é observada quando um camundongo é colocado em uma arena contendo um abrigo com indivíduos dentro, em comparação a quando o camundongo fica localizado em uma gaiola acima da arena (Ferreira, Guarneri & Lorenzo, 2019; Marlière *et al.*, 2015).

Os triatomíneos realizam alimentações esporádicas e volumosas. Em cada fase do ciclo de vida estes insetos se alimentam de diferentes volumes de sangue (Friend, Choy & Cartwright, 1965; Guarneri *et al.*, 2003). Ninfas de *R. prolixus* chegam a ingerir quantidades de sangue de ~9 vezes o seu peso corporal. Os adultos desta espécie ingerem quantidades diferentes de sangue dependendo do sexo. Enquanto as fêmeas consomem três vezes o seu peso, os machos ingerem quantidades menores. Repastos sanguíneos completos promovem a muda em ninfas e a produção de ovos em fêmeas, além de manter os insetos por longos períodos de jejum (Friend, Choy & Cartwright, 1965). A digestão dessas grandes quantidades de sangue é lenta e pode levar de 10 a 15 dias (Friend, Choy & Cartwright, 1965), ocorrendo majoritariamente no intestino médio posterior do inseto (Ribeiro *et al.*, 2014). As reservas energéticas provenientes da digestão são armazenadas no corpo gorduroso, órgão que também é responsável pela síntese e utilização de energia nestes insetos. Este tecido relativamente grande ocupa os espaços entre os órgãos do inseto, preferencialmente circulando o intestino e os órgãos reprodutores (quando presentes) e está em contato direto com a hemolinfa (Dean *et al.*, 1985). Nele são armazenadas substâncias como lipídeos e carboidratos excedentes, e sintetizados metabólitos circulantes da hemolinfa fundamentais para sustentar comportamentos como a atividade locomotora e o forrageamento (Law & Wells, 1989). Noventa por cento dos lipídeos são armazenados no corpo gorduroso na forma de trigliceróis, sendo esse o componente mais abundante do órgão (Canavoso, *et al.*, 2001). Outras importantes fontes de energia para os triatomíneos armazenados no corpo gorduroso são os carboidratos e os aminoácidos. Glicosidades secretadas no intestino médio hidrolisam os carboidratos liberando moléculas de glicose. Essas moléculas são absorvidas e armazenadas no corpo gorduroso na forma de glicogênio.

A utilização dos lipídeos e carboidratos armazenados para sustentar necessidades metabólicas requer a atuação do hormônio adipocinético. Os peptídeos desta família atuam na ativação de enzimas como o glicogênio fosforilase

e triacilglicerol que irão quebrar o glicogênio e o triacilglicerol armazenados no corpo gorduroso e liberar metabólitos circulantes como a trealose, os fosfolídeos e diacilgliceróis na hemolinfa (Steele, 1982; Canavoso *et al.*, 2001; Thompson, 2003; Grillo *et al.*, 2007; Majerowicz *et al.*, 2016). A trealose é um dissacarídeo e o principal açúcar da hemolinfa na maioria dos artrópodes (Becker *et al.*, 1996).

Variações genéticas podem resultar em diferenças intraespecíficas nas reservas energéticas em diferentes grupos de insetos (Toth & Robison, 2005; Kaun, Chakaborty-Chatterjee & Sokolowski, 2008). Em *D. melanogaster*, as larvas com altos níveis de atividade locomotora (*rover*) apresentam menos carboidratos no corpo gorduroso do que as larvas com baixos níveis de atividade locomotora (*sitter*). Adicionalmente, a privação de alimentos promove a diminuição na quantidade de carboidratos na hemolinfa, e lipídeos totais nas *rovers*, mas não afeta as *sitters* (Kaun, Chakaborty-Chatterjee & Sokolowski, 2008). Nas abelhas da espécie *A. mellifera*, as forrageiras apresentam níveis lipídicos mais baixos que as abelhas responsáveis por alimentar as larvas no interior da colmeia (Toth & Robinson, 2005). Em ambos os casos, especula-se uma potencial conexão entre o gene *foraging* e o metabolismo lipídico.

Em um estudo anterior, mostramos que os níveis de atividade locomotora de ninfas de *R. prolixus* foram alterados pela infecção por tripanossomas. Essas mudanças coincidiram com uma expressão alterada de *Rpfor*, o ortólogo do gene *foraging* em *R. prolixus*, sugerindo a participação desse gene na modulação da atividade de triatomíneos (Marlière, *et al.*, 2015). Além disso, observamos no mesmo estudo uma elevada variabilidade individual na quantidade de movimentos dentro da amostra de indivíduos analisados. Sendo assim, no presente estudo caracterizamos os perfis individuais de atividade locomotora de *R. prolixus* utilizando análises multivariadas que permitiram avaliar se essas variações poderiam estar correlacionadas com a expressão do gene *Rpfor* e com o sexo dos indivíduos. Posteriormente, silenciámos os genes *Rpfor* e *RpNPF* e avaliamos o seu efeito sobre a atividade locomotora e a dinâmica de forrageamento de indivíduos em jejum. Finalmente, avaliamos se o silenciamento destes genes afeta parâmetros nutricionais de *R. prolixus*. Para isso medimos a quantidade de triglicerídeos no corpo gorduroso e na hemolinfa, e de açúcares totais na hemolinfa de ninfas de *R. prolixus* silenciadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar o padrão de atividade locomotora de *R. prolixus* e potenciais fatores envolvidos na sua modulação.

2.2 Específicos

2.2.1. Caracterizar perfis individuais de atividade locomotora não orientada em ninfas de *R. prolixus*;

2.2.2. Avaliar a influência da expressão do gene *Rpfor* e do sexo sobre os perfis individuais de atividade locomotora;

2.2.3. Silenciar, através da técnica de RNA interferente (RNAi), os genes *Rpfor* e *RpNPF*;

2.2.4. Avaliar o efeito do silenciamento gênico sobre a atividade locomotora e a dinâmica de forrageamento de indivíduos em jejum.

2.2.5. Avaliar o efeito do silenciamento gênico sobre a quantidade de triglicerídeos armazenados no corpo gorduroso de indivíduos em jejum.

2.2.6. Avaliar o efeito do silenciamento gênico sobre a quantidade de triglicerídeos e de açúcares totais circulantes na hemolinfa.

3. METODOLOGIA

3.1. Insetos

Os espécimes de *Rhodnius prolixus* utilizados em nosso estudo vieram de uma colônia derivada de insetos coletados em Honduras na década de 1990 e são mantidos pelo Grupo de Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos no Instituto René Rachou, Belo Horizonte, Brasil. Os insetos são criados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ UR, com ciclo natural de iluminação. A colônia é mantida através de alimentações mensais com sangue de coelho citratado obtido do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL, Fiocruz, Rio de Janeiro) oferecido através de um alimentador artificial a 37°C , e sangue de galinhas anestesiadas com injeções intraperitoneais de uma mistura de cetamina (20 mg / kg; Cristália - Brasil) e detomidina (0,3 mg / kg; Syntec - Brasil). Todos os ensaios que utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA-FIOCRUZ, sob o número de licença LW-61/2012.

3.2. Registro da atividade locomotora

A atividade locomotora das ninfas foi avaliada por meio de um sistema automatizado desenvolvido previamente pelo nosso grupo (Marlière et al, 2015). Este dispositivo consiste de 40 unidades de registros individuais (caixas de 5 cm x 10 cm x 2 cm) dispostas em um circuito maior que integra os dados (Figura 2). Cada unidade contém três fotodiodos emissores de luz infravermelha (LEDs, *light emitting diodes*) posicionados frente a frente com seus respectivos receptores. Os LEDs foram instalados de maneira equidistante ao longo do maior lado do retângulo de cada unidade, de maneira que ofereciam cobertura a maior parte do espaço onde o inseto podia se locomover. O sistema é baseado no fato de que qualquer movimentação do inseto dentro da arena que interrompa o feixe de luz infravermelho gera um sinal que é enviado e armazenado em um computador associado. Vale ressaltar que os triatomíneos não percebem os comprimentos de onda da iluminação infravermelha emitida pelos LEDs (Reisenman, Insausti & Lazzari, 2002). O dispositivo ficava localizado dentro de uma câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), com iluminação de 60 LUX e fotoperíodo de 12 horas (12:12 LE).

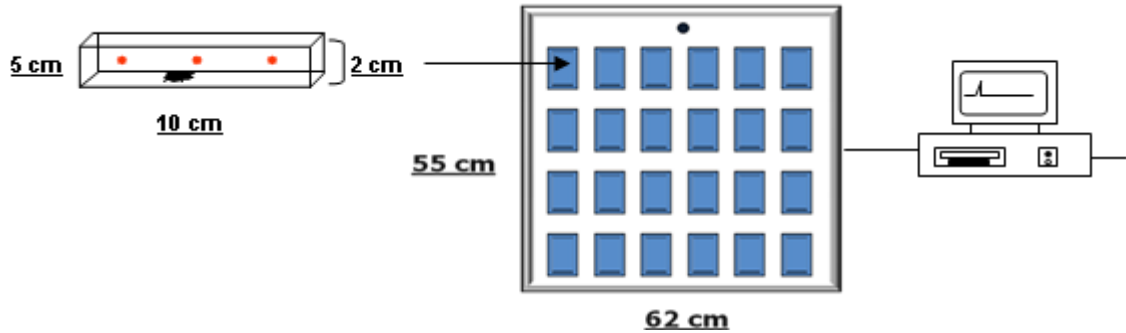


Figura 2. Representação esquemática do actômetro. Os retângulos azuis representam as unidades (40) que foram dispostas sobre uma placa de metal. No detalhe à esquerda, uma unidade apresenta os três pares de fotodiodos IV indicados pelos pontos vermelhos.

3.3. Extração de RNA e síntese de cDNA

Inicialmente, a expressão do gene *Rpfor* foi avaliada em “pools” contendo 5 amostras de cérebros ou de corpos gordurosos dissecados de insetos com diferentes status fisiológicos (Figura 3). Como os padrões de expressão gênica se mostraram semelhantes para os dois órgãos, decidimos usar amostras de corpos gordurosos, que forneciam maiores quantidades RNA e possibilitavam a análise individual dos insetos. O RNA total foi extraído utilizando-se TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA), de acordo com as instruções do fabricante, ressuspendido em 20 µL de água DEPEC (água tratada com dietil pirocarbonato) e tratado com o kit Turbo DNA-free (Invitrogen, Vilnius, Lituânia) para eliminar o DNA genômico. A concentração das amostras foi determinada usando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Eugene, Oregon - EUA). O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de mRNA usando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Fitchburg, WI - EUA) e um oligo dT primer modificado (MgdT 5'-CGGGCAGTGAGCAACG (T12) -3') (Ursic-Bedoya *et al.*, 2008) nas seguintes condições: 37°C por 90 min e 95°C por 5 min.

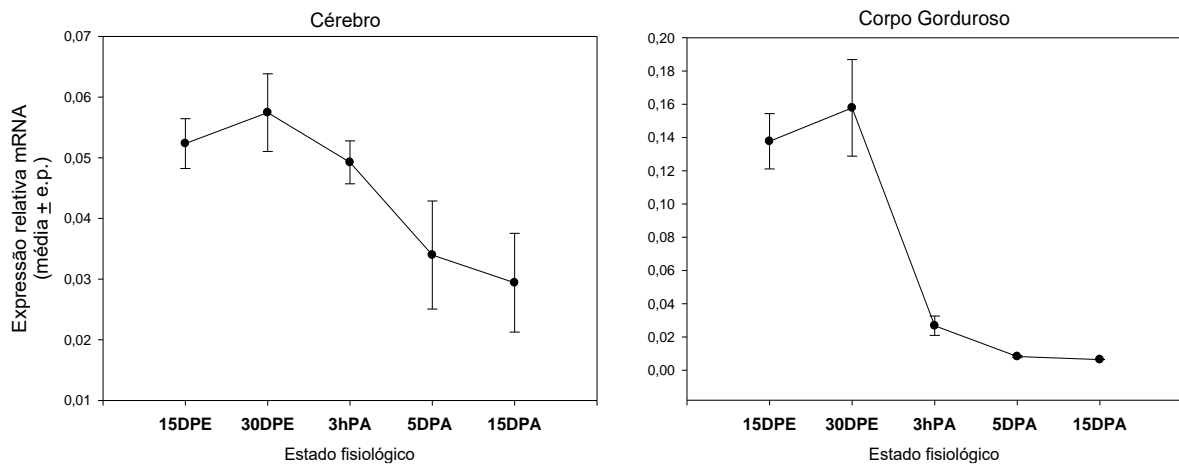


Figura 3. Expressão relativa do gene *Rpfor* no cérebro e corpo gorduroso de ninfas de *Rhodnius prolixus* em diferentes condições fisiológicas (D=dias; h=horas; PE=pós-ecdise; PA=pós-alimentação).

3.4. Quantificação da expressão relativa de genes

Iniciadores específicos para os genes *Rpfor* e *RpNPF* (Quadro 1) foram utilizados nas reações de RTq-PCR para avaliar os níveis de expressão gênica individual das ninfas fêmeas e machos de *R. prolixus*. Todas as reações continham 1 μ L de cDNA, 0,5 μ L de cada iniciador (10 nM) e 5 μ L de Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA) em um volume final de 10 μ L. As reações foram realizadas no qReal-Time PCR Facility - RPT09D PDTIS; Instituto René Rachou, FIOCRUZ, MG, em um sistema ViiA 7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA) sob as seguintes condições: 10 min a 96°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 20 seg a 60°C. Análises da curva de dissociação (melting) confirmaram a especificidade da reação. As amostras foram analisadas em duplicata. A expressão relativa de cada gene foi determinada através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando-se o gene de referência α -tubulina (TUB) como controle de normalização (Paim *et al.*, 2012) (Quadro 1). Um controle negativo sem cDNA (substituído por água livre de RNA e DNA) foi incluído em cada placa para cada conjunto de iniciadores utilizados, para descartar a possibilidade de contaminação dos reagentes e a presença de dímeros de iniciadores.

3.5. Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) – síntese e introdução do RNA de fita dupla

Os cDNAs previamente sintetizados foram utilizados em reações de PCR de 35 ciclos: 94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 s e 72°C durante 30 s, com 3 µL de cDNA, 200 µM de dNTPs, 200 nM de cada iniciador e 3 uL de goTaq polimerase (Promega, Fitchburg, WI - EUA) em um volume final de 60 µL. Os iniciadores específicos para o gene *Rpfor*, *RpNPF* e queratina de camundongo (KER) utilizados na reação de PCR foram conjugados com um promotor T7 de 23 pares de bases (Quadro 1). Para a síntese dos cDNAs de KER, um pequeno pedaço da ponta da cauda de um camundongo foi obtido, macerado com o auxílio de um pistilo e submetido à extração de RNA total e à reação de transcriptase reversa (RT) como descrito anteriormente. RNAs de dupla fita (dsRNA) foram produzidos a partir dos produtos da PCR com o auxílio do kit MEGAscript T7 (Invitrogen, Vilnius - Lituânia) de acordo com as recomendações do fabricante. Primeiramente, os produtos de PCR contendo o promotor T7 em ambas as extremidades foram incubados a 37°C por 4 h. Depois de sintetizados, os dsRNAs foram tratados com a DNase RQ1 por 30 min. Em seguida, os dsRNAs foram precipitados a -20°C “overnight” com isopropanol 100%, lavados duas vezes com etanol 70% e ressuspensos em 180 µL de água livre DNase/RNase. Um microlitro de dsRNA diluído 1:50 foi quantificado por espectrofotometria no NanoDrop™ (Thermo Scientific). Após a quantificação, o material foi secado e ressuspensado em solução salina (PBS) nas concentrações de 5 e 10 µg/µL. A qualidade dos dsRNAs gerados foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 2%.

Os genes foram silenciados através da injeção intracelomática do dsRNA ressuspensado em tampão fosfato salina estéril (PBS 0,15M; NaCl em 0,01 M fosfato de sódio, pH 7,4) com o auxílio de uma seringa acoplada a um dispensador (Hamilton Company, Nevada – EUA) em ninfas de quarto estágio com 10 a 14 dias de jejum após a ecdise. Ninfas de quarto estágio injetadas apenas com solução salina e dsRNA de queratina de camundongo (dsRNA inespecífico) foram utilizadas como controle. A confirmação do silenciamento dos genes alvo foi confirmada em diferentes tempos após a injeção, através da quantificação da expressão relativa dos mesmos por RTq-PCR como descrito anteriormente. Um controle negativo da transcrição reversa foi adicionado em cada placa para cada primer utilizado com a finalidade de confirmar a ausência de contaminação e amplificação de DNA

genômico. Nesse controle foram utilizados pools de RNA de cada grupo avaliado que foram submetidos aos procedimentos descritos no item 3.3, sem a adição da enzima transcriptase reversa.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores; comprimento do amplicon e intron, R²: coeficiente de correlação; E: eficiência da qPCR.

Gene	Primer (5'to 3')	Amplicon (pb)	Intron (pb)	R ²	E (%)
<i>Tub</i>	For-TGTGCCCAAGGATGTGAACG Rev- ACAGTGGGTGGTTGGTAGTTGAT	118	202	0.991	107 %
<i>Rpfor</i>	For-CAGAGATAACCCTGCGGAAC Rev-CATGCGTAAACCTTCCCAAT	103	1707	0.99	99 %
<i>RpNPF</i>	For-CGGACGACCTAAGGACCTATC Rev-TGACACCGTCCACTGCTAGA	123	1198	0.996	93 %
T7- <i>Rpfor</i>	For-TAATACGACTCACTATAGGGAGA ACTGGTGCAGATAGCACACG Rev-TAATACGACTCACTATAGGGAGA CCATGTTTTCTACCGTGCT3	424	3500	-	-
T7- <i>RpNPF</i>	For-TAATACGACTCACTATAGGGAGA CGTATTCCAGCTGACGCAAT3 Rev-TAATACGACTCACTATAGGGAGA AGATCGTAGAGGTCGCTTGC3	265	1294	-	-
T7-KER	For-TAATACGACTCACTATAGGGAGA GGGTCTCCTCTCTGGAAC3 Rev-TAATACGACTCACTATAGGGAGA ATTAGCAGCCGTGGAAGAGA	275	-	-	-

3.6. Quantificação de triglicerídeos no corpo gorduroso e na hemolinfa de *R. prolixus* silenciados

3.6.1. Corpo gorduroso

Insetos inoculados com dsRNAs dos genes *Rpfor*, *RpNPF*, KER ou PBS, tiveram seu corpo gorduroso dissecado 40 dias após a ecdise (~63 dias pós-inóculo). Os órgãos obtidos foram pesados e posteriormente homogeneizados com o auxílio de esferas de vidro (Sigma-Aldrich, Missouri - EUA) em 200 µL de PBS. Deste total, 3 µL da mistura foram utilizados na dosagem de triglicerídeos. A quantificação dos triglicerídeos foi realizada por método colorimétrico enzimático utilizando-se o kit Interkit Triglicérides (Katal Biotecnológica, Belo Horizonte - Brasil). Conforme instruções do fabricante, em uma placa de ELISA de 96 poços, foram adicionados 200 µL/poço do reagente enzimático e 3 µL da mistura de corpo gorduroso + PBS de cada amostra. As dosagens foram feitas em duplicata e a

quantidade estimada por comparação com a solução padrão fornecida pelo kit. A quantificação das amostras foi feita em espectrofotômetro utilizando-se a absorvância de 500 nm (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, Califórnia - EUA). Os dados obtidos de cada amostra foram normalizados pelo respectivo peso do corpo gorduroso inteiro para evitar discrepâncias proporcionadas por insetos de diferentes tamanhos.

3.6.2. Hemolinfa

Para a quantificação de triglicerídeos na hemolinfa, ninfas de quinto estágio previamente inoculadas com dsRNAs dos genes *Rpfor*, *RpNPF*, KER ou PBS (~63 dias pós-inóculo) foram alimentadas em alimentador artificial com sangue de coelho citratado. A alimentação dos insetos foi necessária para que fosse possível coletar a quantidade necessária de hemolinfa para realizar o teste, uma vez que os volumes de hemolinfa circulante ficam bastante reduzidos em indivíduos em jejum. Três dias após a alimentação, uma amostra de 5 µL de hemolinfa foi coletada do tarso de cada ninfa e homogeneizada em 5 µL de solução anticoagulante para insetos (0,01 M ácido etilenodiamino tetra-acético; 0,1 M glucose; 0,062 M cloreto de sódio; 0,03 M citrato de sódio; 0,026 M ácido cítrico; P.H. 4,6). Deste total, 2 µL foram utilizados para a dosagem de triglicerídeos. A quantificação foi realizada conforme descrito no item 3.6.1.

3.7. Quantificação de açúcares totais na hemolinfa de *R. prolixus* silenciados

Para a quantificação dos açúcares totais presentes na hemolinfa, ninfas de quinto estágio previamente inoculadas com dsRNAs dos genes *Rpfor*, *RpNPF*, KER ou solução salina (~63 dias pós-inóculo), foram alimentadas em alimentador artificial com sangue de coelho citratado. Três dias após a alimentação, uma amostra de 10 µL de hemolinfa foi coletada do tarso de cada ninfa e homogeneizada em 35 µL de PBS. Deste total, 20 µL foram utilizados para a dosagem de açúcares. A quantificação dos açúcares totais foi realizada por método colorimétrico segundo metodologia de Dubois e colaboradores (1956), com modificações. Em uma placa de ELISA com 96 poços, foram adicionados 20 µL/poço de fenol 5%, 20 µL da mistura de PBS + hemolinfa de cada amostra e por fim, 100 µL de ácido sulfúrico concentrado. A quantidade de açúcares foi estimada por comparação a uma curva padrão preparada com 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 µL de glicose 1%. Todas as dosagens

foram feitas em duplicata e a absorvância medida no espectrofotômetro foi de 490 nm (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, Califórnia - EUA).

3.8. Ensaios biológicos

3.8.1. Avaliação de perfis individuais de atividade

Ninfas de quinto estágio com 30 dias de jejum após a ecdise foram usadas nos experimentos. Em cada ensaio, as ninfas foram colocadas individualmente nas unidades de registro que continham um pedaço de papel filtro como substrato (5 x 10 cm) e o número de movimentos foi continuamente registrado para cada indivíduo. Em um experimento preliminar, 32 ninfas foram liberadas e seus movimentos registrados por 72 h. A comparação do número de movimentos registrados nos três intervalos diários mostrou que 21 ninfas reduziram sua atividade total diária em $25 \pm 3\%$ e 10 aumentaram a atividade em $24,5 \pm 6\%$ do primeiro para o segundo dia. Resultados semelhantes foram observados quando o primeiro dia foi comparado com o terceiro dia (23 ninfas diminuíram a atividade em $29,6 \pm 3\%$, enquanto nove aumentaram em $22,5 \pm 5\%$). Do segundo para o terceiro dia, 26 ninfas diminuíram a atividade em $12 \pm 1\%$, enquanto seis ninfas aumentaram a atividade em $15 \pm 5\%$ (dados individuais mostrados na Figura 4). Como o número de movimentos ao longo do intervalo registrado mostrou menor variabilidade após o primeiro dia, optamos por restringir a amostragem de dados subsequentes ao segundo dia.

Dois experimentos foram realizados para analisar os perfis de atividade locomotora não orientada. Um primeiro caracterizou o perfil de atividade de 548 ninfas ao longo do intervalo de 24 h. Em um segundo experimento 65 ninfas identificadas pelo sexo (Espínola, 1966) e com diferentes perfis de atividade foram selecionadas. Estes indivíduos foram utilizados para quantificar a expressão relativa do gene *Rpfor* por RTq-PCR. Foram utilizados no total, 32 machos e 33 fêmeas.

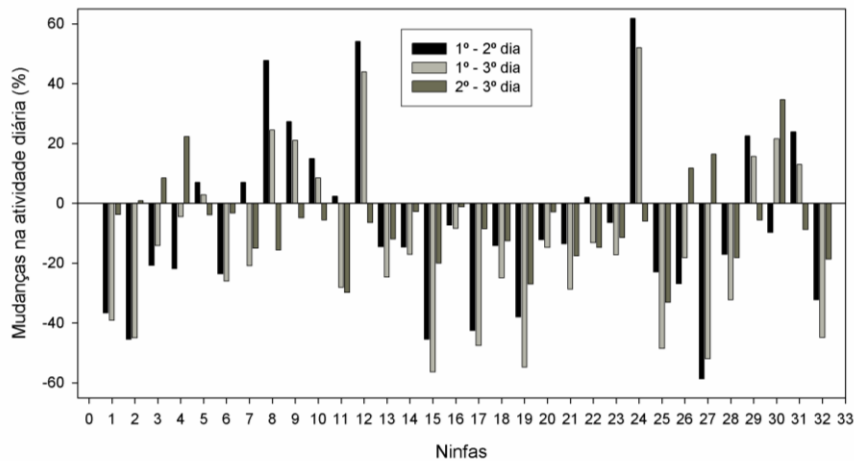


Figura 4. Redução/aumento (%) da atividade locomotora não orientada total de ninfas de 5º estágio ao longo de três dias de avaliação no actômetro.

3.8.2. Avaliação *in vivo* da função do gene *foraging* através do silenciamento por RNAi

3.8.2.1. Atividade locomotora não orientada

A avaliação da atividade locomotora de ninfas silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* foi realizada no actômetro, conforme descrito anteriormente. Sete dias após o inóculo do dsRNA, as ninfas foram alimentadas e 30 dias após a muda para o quinto estágio, foram liberadas no actômetro e tiveram sua atividade locomotora registrada por 48 h. Finalizados os ensaios de locomoção, os cérebros e os CGs foram dissecados (~60 dias após o inóculo de dsRNA). Estes tecidos foram submetidos à extração de RNA total, produção de cDNA e RTq-PCR para confirmar o silenciamento dos genes alvos.

3.8.2.2. Saída do abrigo na presença de pistas do hospedeiro

A dinâmica do uso de abrigos de ninfas silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Lorenzo e Lazzari (1996, 1998), com modificações. Os ensaios foram realizados em uma arena de vidro (40 x 40 x 20 cm) que apresentava um abrigo artificial na área central (Figura 5). O abrigo foi feito de um pedaço de papelão ondulado (20 x 10 cm) dobrado ao meio para criar um refúgio de 10 cm² com dois acessos laterais de aproximadamente 0,5 cm de altura. Para o ensaio foram utilizadas ninfas de quinto

estádio com aproximadamente 35 dias de jejum e 58 dias pós-inóculo com dsRNAs dos genes *Rpfor*, *RpNPF*, queratina de camundongo, e PBS. Em cada ensaio, 10 ninfas de cada tratamento foram simultaneamente liberadas na arena e mantidas por 72 horas até a aclimatação. As ninfas de cada grupo foram identificadas com o auxílio de um corretivo líquido (inodoro e não tóxico) através da pintura de uma de suas seis patas. Após a aclimatação, todas as ninfas encontradas fora dos abrigos foram removidas e o número de indivíduos utilizados para o ensaio foi registrado. Um camundongo (pesando ~ 40 g) mantido em um recipiente de plástico cilíndrico (10 cm de altura x 8 cm de diâmetro) fechado com uma tampa de plástico perfurada foi colocado na arena. O recipiente impedia qualquer contato físico das ninfas com o camundongo, mas permitia a emissão de estímulos químicos (odores) e físicos (vibração e calor), sinalizando a presença de um hospedeiro. Na parede externa do frasco que continha o hospedeiro e no chão da arena na área em torno do frasco foi colocada uma fita dupla face (2,5 cm de largura). O camundongo foi colocado na arena duas horas antes do final da fotofase e lá permaneceu durante toda a escotofase e até duas horas após o início da fotofase. Os camundongos receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período. Durante a fotofase, lâmpadas fluorescentes com uma intensidade luminosa de aproximadamente 160 LUX iluminavam a arena. A temperatura ambiente foi mantida em $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12:12 LL/EE. Após a finalização do ensaio, o número de ninfas presas na fita dupla face foi contabilizado

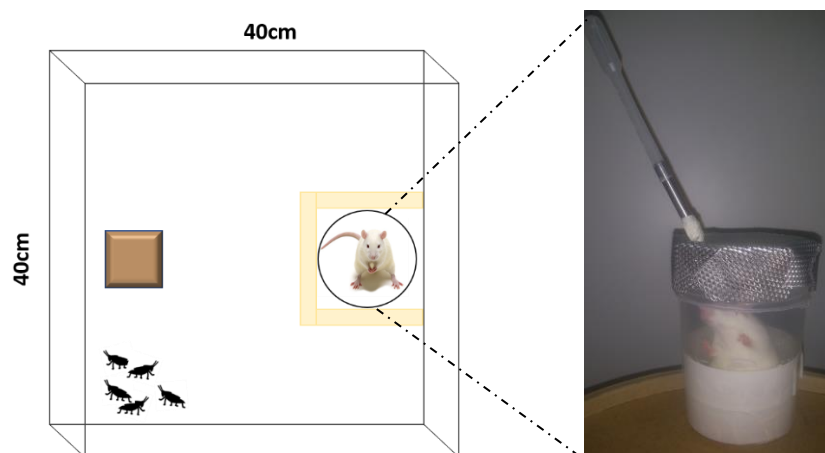


Figura 5. Desenho esquemático do ensaio que avaliou o comportamento de saída de abrigos de ninfas de *R. prolixus* silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* na

presença de hospedeiro. À direita, detalhe do recipiente de plástico cilíndrico que conteve o camundongo e em torno do frasco a fita dupla face.

3.8.2.3. Comportamento alimentar

Para avaliar se o silenciamento dos genes *Rpfor* e *RpNPF* interfere na ingestão de sangue, insetos silenciados e seus respectivos controles foram pesados, individualizados em potes circulares de plástico (4 cm de diâmetro e 2 cm de altura) e identificados. Os recipientes de plástico continham em seu interior uma sanfona de cartolina e eram fechados com tecido de algodão na parte superior. Aproximadamente 20 insetos de cada grupo foram colocados individualmente para se alimentarem em alimentador artificial contendo sangue de coelho citratado. Imediatamente após o término da alimentação, as ninfas foram pesadas. Foi registrado o tempo que os insetos levaram para iniciar e para terminar a alimentação, o volume de sangue ingerido e a velocidade de ingestão, calculada através da divisão da quantidade de sangue ingerida pelo tempo que o inseto levou para se alimentar.

3.9. Análise estatística

3.9.1. Cluster hierárquico e análises multivariadas

Duas matrizes de dados foram construídas considerando os perfis de atividade de ninfas individuais. O primeiro conjunto de dados abrangeu os registros obtidos com 548 indivíduos durante o intervalo de 24 horas. Para o segundo conjunto de dados foram incluídos o número de movimentos e dados moleculares obtidos com as ninfas classificadas por sexo. A análise dos dados foi realizada utilizando o software R (v3.4) na interface Rstudio versão 1.1.423 (Team, 2015). O dendograma de cluster hierárquico e o mapa de calor (Heatmap) correspondente foram gerados usando o pacote heatmap3 (v1.1.1). Como consideramos a ausência de movimento (ausências articulares) biologicamente informativa, optamos por seguir o fluxo de trabalho sugerido por Anderson *et al.* (2011). Isso implicou em estimar as diferenças de pares entre os objetos na matriz com base em contagens brutas não transformadas e índices euclidianos. Para esse fim, a função 'vegdist' do pacote R 'vegan' (v2.5.2) foi chamada no script de função heatmap3. Para abordar o efeito de variáveis biológicas potencialmente relevantes responsáveis pela variação nas matrizes, foram realizados testes de ordenação multivariados do tipo RDA

(análise de redundância com base em uma regressão linear comum não ponderada e decomposições de variáveis singulares não ponderadas), considerando suas respectivas matrizes explicativas (dummy matrizes). Resumidamente, para cada um dos conjuntos de dados avaliados, as matrizes simuladas continham dados explicativos, como sexo [masculino / feminino] (para 65 ninfas); contagem total de locomoção durante o período de 24 horas; e coeficientes de expressão gênica normalizados (para 65 ninfas). As análises e os biplots correspondentes (escala = 2, gráficos de correlação com foco nas variáveis de resposta) foram gerados usando a função 'rda' do pacote 'vegan' (v2.4.6). Por fim, para avaliar se as restrições hipotetizadas poderiam explicar significativamente a variação nos conjuntos de dados e assim, como as respostas e as variáveis explicativas interagem, testes MANOVA baseados em permutação (PERMANOVA) foram realizados usando a função 'adonis2' dentro do pacote 'vegan' (mesma versão acima mencionada) executando 9.999 permutações (Anderson, 2001; Anderson & Walsh, 2013). Essa análise multivariada também gera uma estimativa do tamanho do efeito (R²) da proporção de variância explicada por cada uma das variáveis explicativas hipotetizadas. Uma abordagem semelhante de teste de hipóteses foi executada por Liu *et al.* (2015), ao abordar como vários fatores biológicos podem contribuir de maneira diferente para a atividade final medida para larvas de zebrafish.

3.9.2. Expressão dos genes *Rpfor* e sua correlação com a atividade locomotora

Os softwares GraphPad Prism 5.0 e SigmaPlot 8.0 foram utilizados nas análises dos dados e construções dos gráficos. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição normal foram testadas pelo ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Variáveis que não apresentaram distribuição normal, foram testadas pelo teste de Mann-Whitney (no caso de dois grupos) e Kruskal-Wallis (no caso de mais de 2 grupos) seguido pelo teste de Dunn. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para examinar se havia uma relação entre a atividade locomotora total (24h) das ninfas machos e fêmeas e os níveis de expressão relativa dos genes-alvo. Para todas as análises foi considerado um $p < 0,05$ como significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação de perfis individuais de atividade de ninfas de *R. prolixus*

O número médio de eventos de locomoção detectados para as 548 ninfas durante o período de 24 h foi de $322,2 \pm 310$ (0-2.753). O perfil de atividade mostrou os característicos dois picos descritos em estudos anteriores (Figura 6). Os horários de pico de atividade (8 e 20 h) concentraram aproximadamente 18 e 16% dos movimentos, respectivamente. Em geral, uma atividade mais alta foi observada durante as primeiras quatro horas da escotofase, o que representou aproximadamente metade de toda a atividade locomotora expressa. No entanto, como indicado pela amplitude dos desvios descritos, o número de eventos de movimento registrados durante o intervalo avaliado variou expressivamente (Figura 6), particularmente durante os intervalos dos picos do dia (luzes acesas) e noite (luzes desligadas) e nas primeiras horas subsequentes.

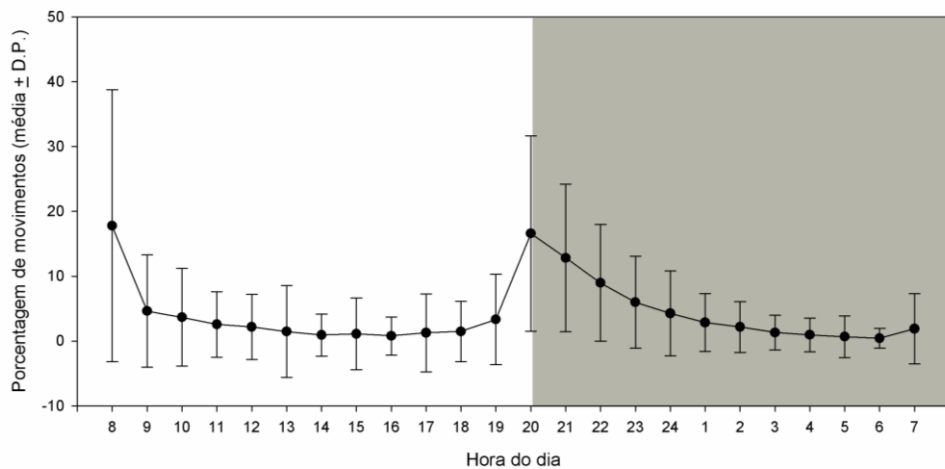


Figura 6. Proporção de movimentos realizados a cada hora (%) por ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* durante um intervalo de 24 horas. As áreas branca e cinza representam a fotofase e a escotofase, respectivamente. Os dados são apresentados como a média \pm D.P. da porcentagem do número de eventos de movimento por hora em relação ao total ($n = 548$ insetos).

Para explorar a origem dessas flutuações, avaliamos se as mesmas poderiam ser devido a diferenças individuais entre os perfis de locomoção, considerando

nosso robusto conjunto de dados ($n=548$). Assim, buscamos padrões subjacentes nos perfis aplicando uma análise multivariada para gerar uma matriz de distância euclidiana em pares entre as contagens horárias de locomoção durante o intervalo de 24 horas. Foi executado um teste de agrupamento hierárquico usando a atividade individual (isto é, número de eventos de locomoção por indivíduo por hora). Como pode ser observado na Figura 7, três blocos principais que abrangem indivíduos com padrões semelhantes de dissimilaridade foram identificados pela topologia do dendograma, heatmap e gráfico de dispersão de atividades (referidos como blocos 1, 2 e 3). O bloco número 1 (azul) contém 168 insetos com uma média de 461 movimentos (113-1.468); o bloco 2 (verde) é composto por 56 indivíduos com uma média de 918 movimentos (410-2.753) e o bloco 3 (rosa) com 324 insetos e uma média de 147 movimentos (0-796). Além disso, ao subdividir o bloco 3 ao longo de seu primeiro nó, os indivíduos se agrupam nos subgrupos A (149) e B (175). A média de atividade correspondente é 251,2 (82-796) e 59,5 movimentos (0-299), respectivamente. Do conjunto total de indivíduos, 30,7% pertencem ao bloco 1, 10,2% ao bloco 2 e 59,1% ao bloco 3 (27,2 e 31,9% nos subgrupos A e B, respectivamente).

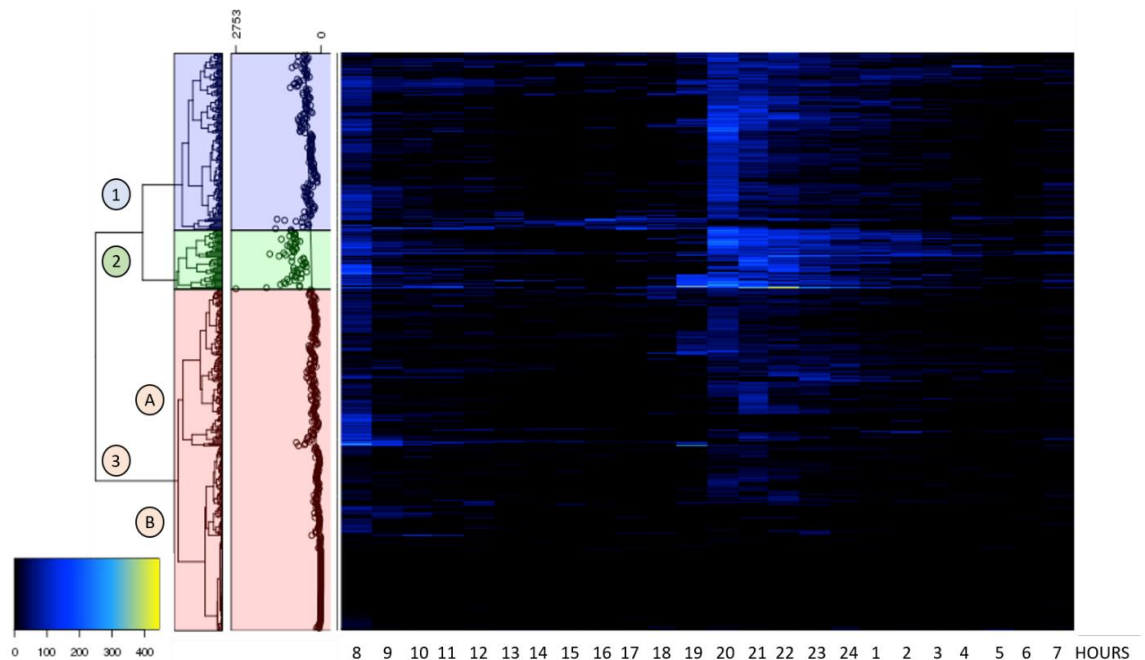


Figura 7. Cluster hierárquico dos perfis de atividade locomotora com base no número de movimentos por hora e suas distâncias euclidianas aos pares. O “heatmap” descreve o grau de dissimilaridade entre os 548 indivíduos durante 24h.

O painel do meio, entre o “heatmap” e o dendograma, apresenta um gráfico de dispersão da atividade total registrada para cada indivíduo ao longo do intervalo selecionado. As áreas coloridas e a linha de tendência no gráfico de dispersão ajudam a visualizar a topologia do dendograma quando discriminam as pontas mais profundas dos nós de acordo com os blocos propostos, com base nas contagens totais de locomoção e nos padrões de dissimilaridade. O bloco número 1 (azul) contém 168 insetos, o bloco 2 (verde) é composto por 56 indivíduos, e o bloco 3 (rosa) por 324 insetos. O bloco três foi subdividido ao longo do seu primeiro nó em grupos A e B, com 149 e 175 indivíduos, respectivamente.

A análise de redundância (RDA) que utilizou a atividade individual cumulativa (número total de eventos de locomoção por indivíduo durante 24 horas) como variável restritiva, foi responsável por 42,59% da variância total dentro dos eixos mostrados na Figura 8 (RDA1; e variância irrestrita resumida em PC1). Deste total, 29,27% da variação foi proporcionada pela variável atividade total (ou seja, número total de eventos de locomoção por indivíduo ao longo de 24 horas), e sua influência sobre os objetos e correlações é representada ao longo do eixo RDA1. As horas que apresentaram a maior resposta ao vetor representando o efeito da locomoção total foram: 20, 21, 22, 23 e 24, considerando seus escores de ordenação (não mostrados). Essas pontuações geradas pela função RDA correspondem a coordenadas dentro do espaço bidimensional em que estão localizadas as pontas dos autovetores. O comprimento do vetor é uma medida da magnitude da variável de resposta (atividade total). As horas da fotofase ficaram agrupadas no quadrante superior direito, enquanto a maioria das horas da escotofase foi agrupada abaixo do vetor de atividade. As horas que precederam o início da fotofase se agruparam próximas ao vetor de atividade, indicando semelhança de perfil para elas. De fato, esse foi o intervalo (exceto às 8h) com menor atividade locomotora, mesmo para ninfas com intensa locomoção. A dispersão observada entre os indivíduos aponta para a existência de perfis de atividade total divergentes. Insetos com atividade baixa ou nula foram posicionados na direção oposta ao vetor de atividade total. Trinta e sete ninfas (6,7%) aglomeraram-se em um ângulo de $\sim 180^\circ$ em relação ao vetor total de atividade, por apresentarem contagem de locomoção zero para todo o intervalo de 24 horas avaliado. À medida que o número de movimentos aumentava, os objetos individuais se distribuíam nas duas dimensões, seguindo um padrão

bimodal, onde indivíduos com contagem total de atividades semelhantes poderiam ser separados ao longo do espaço ordenado (exemplos de perfis de atividades individuais por hora com contagens de atividades semelhantes, mas com perfis locomotores diferentes estão mostrados na Figura 9). Eles correspondem aos elementos seguindo a direção do vetor de atividade (com um ângulo $<90^\circ$ entre eles). Quanto mais eles seguem o vetor explicativo, maior a magnitude de sua resposta a essa restrição, e a sua dissimilaridade com os outros indivíduos.

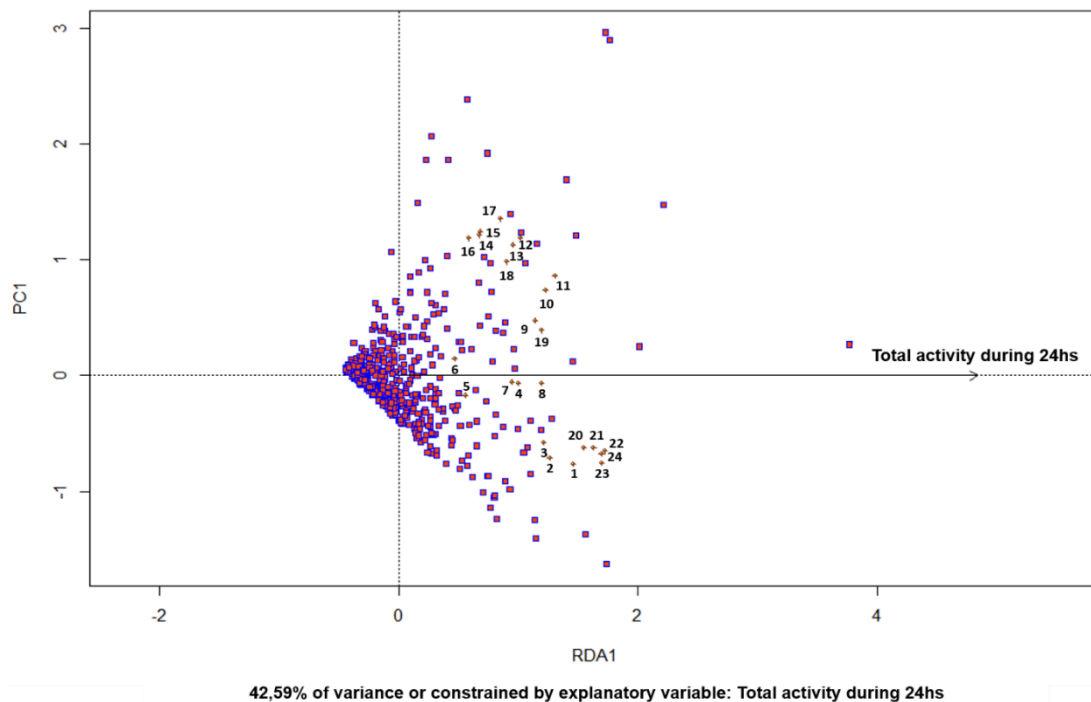


Figura 8. Biplot de análise de redundância (RDA) considerando a atividade total ao longo de um intervalo de 24 horas como variável explicativa. A RDA mostra como os indivíduos se dispersaram no espaço de ordenação (restrito) com base nas diferenças euclidianas entre seus perfis de locomoção. Os padrões de variação dentro do conjunto de dados de medidas variáveis de resposta foram limitados pelas contagens totais de atividades registradas durante um intervalo de 24 horas (vetor apontando diretamente ao longo do eixo horizontal). No total, 42,59% da variação está representada no biplot. A variável “dummy” proposta (atividade total) responde por 29,27% da variação total na matriz de resposta e é representada como o eixo RDA1. O eixo PC1 abrangeu 13,32% da variância irrestrita. Cada quadrado representa um indivíduo no espaço ordenado. Os números representam as horas do dia.

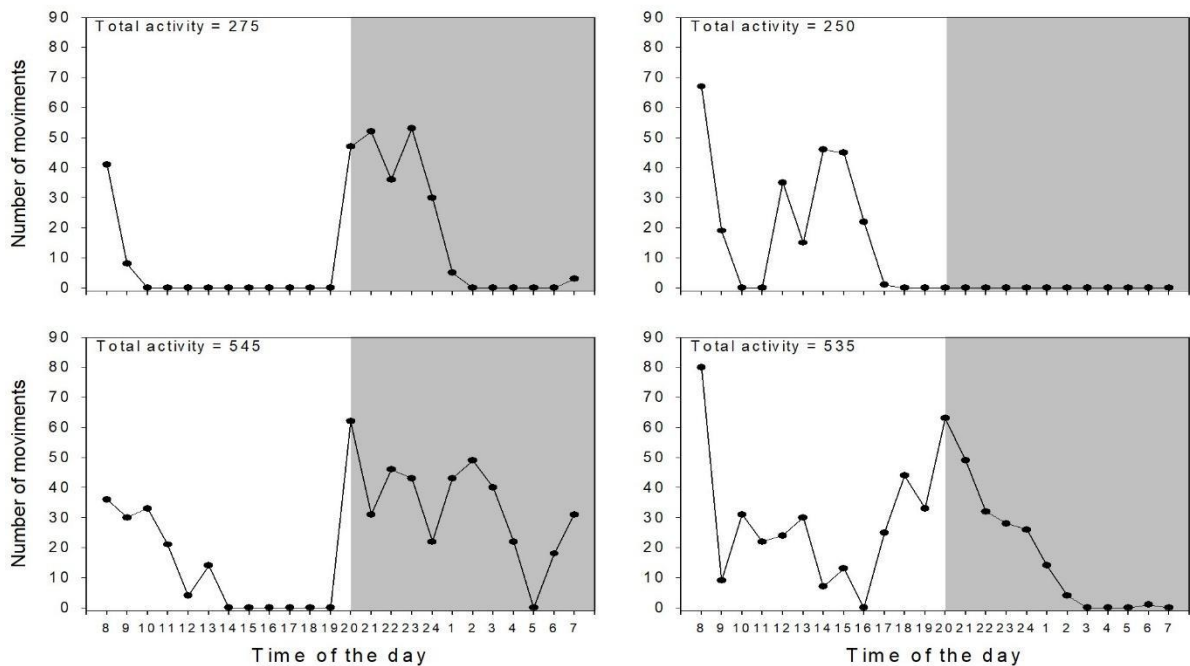


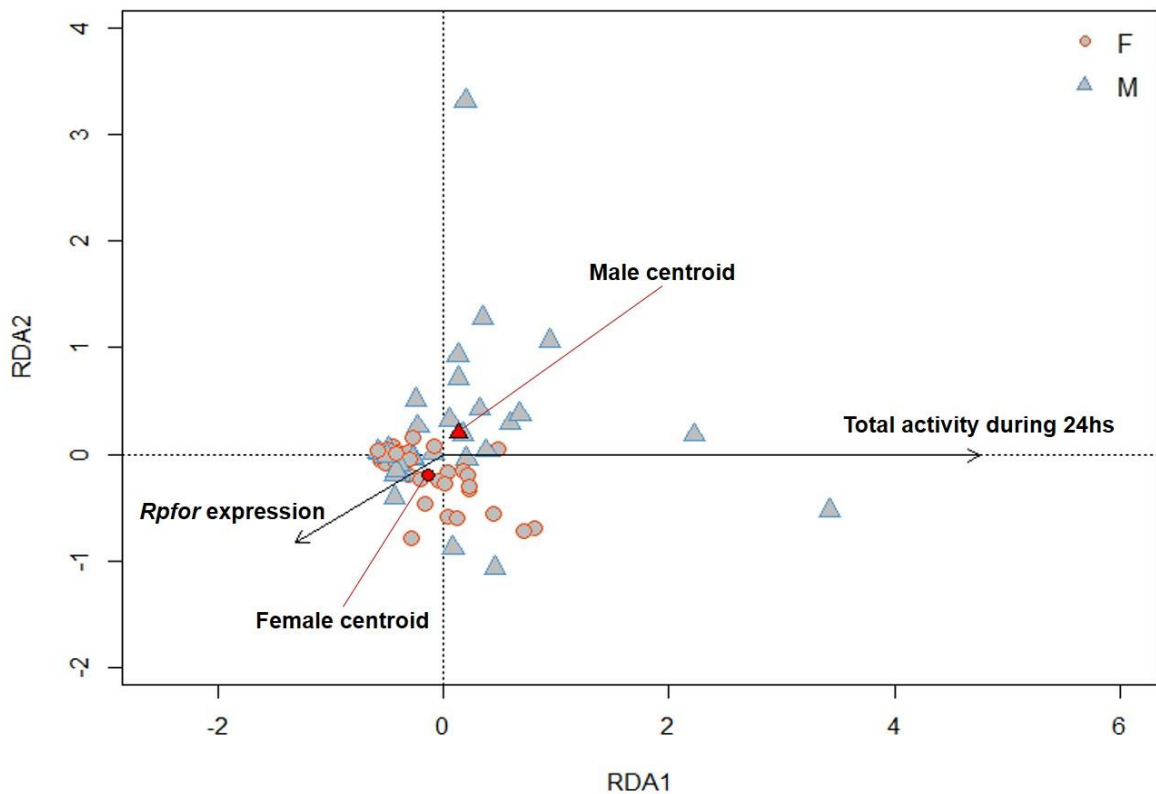
Figura 9. Exemplos de perfis de atividade individual (números de eventos por hora) mostrando quantidades similares de contagem de movimentos total, mas diferentes perfis temporais. As áreas branca e cinza representam a fotofase e a escotofase, respectivamente. Cada gráfico é apresentado como o número de eventos de movimento por hora de uma ninfa fêmea.

4.2. Avaliação da influência de fatores biológicos na atividade locomotora de *R. prolixus*

Na tentativa de encontrar outros fatores potencialmente associados aos diferentes perfis de atividade locomotora, uma nova RDA foi realizada, utilizando-se a atividade individual de 65 ninfas ao longo de 24 h, e considerando o número cumulativo de movimentos em 24 horas, o sexo, e a expressão do gene *Rpfor* como variáveis explicativas (Figura 10). De acordo com esta análise, 45,32% da variação entre perfis pôde ser explicada por essas três variáveis. A atividade locomotora total durante 24 h foi a variável com maior magnitude vetorial. Os valores dos centroides das ninfas macho e fêmea foram posicionados em um ângulo de $\sim 180^\circ$ em relação ao outro (Figura 10). Isso sugere que ninfas machos e ninfas fêmeas apresentam diferentes perfis de atividade locomotora. Nós testamos a hipótese de diferenças sexuais em um terceiro conjunto de dados (Figura 11; $n=175$) e obtivemos padrões e interações subjacentes semelhantes. Como pode ser observado na Figura 10, o vetor que representa os valores de expressão do gene

Rpfor ficou posicionado em um ângulo de $\sim -270^\circ$ em relação ao vetor de atividade total, o que sugere uma correlação negativa entre os valores registrados. Ao observar o padrão de dispersão dos objetos e sua correspondente média geométrica (centroide), pôde-se observar uma relação positiva entre a expressão de *Rpfor* e o centroide das fêmeas (Figura 10). Essa pequena distância ortogonal entre o centroide e o vetor (com uma direcionalidade $<90^\circ$ entre eles) sugere que valores mais altos de expressão de *Rpfor* foram mais frequentes nas fêmeas do que nos machos. A Figura 10 mostra que o oposto pode ser inferido entre os machos e a expressão de *Rpfor* ($\sim 180^\circ$ entre o centroide e o vetor explicativo). Nós então comparamos os níveis de expressão relativa de *Rpfor* em ninfas machos e fêmeas e encontramos uma expressão relativa do gene significativamente mais alta para as fêmeas (Figura 12, Mann Whitney, $p=0,019$), corroborando a associação mostrada pela RDA.

Um teste PERMANOVA foi realizado para medir a significância com que cada uma das variáveis propostas explicava as variações da matriz de resposta (Tabela 1). No total, cada uma das variáveis testadas e a interação entre elas explicaram 66,29% da variância incluída na matriz de resposta. Como esperado, a atividade locomotora total durante 24 h foi a variável explicativa que afetou os perfis de locomoção mais significativamente, apresentando o maior tamanho do efeito (Tabela 1; PERMANOVA, $p=0,001$). As variáveis explicativas sexo, expressão de *Rpfor* e a interação entre sexo e atividade total também foram significativas, mas com tamanhos do efeito menores (Tabela 1; PERMANOVA, $p=0,004$, $p=0,005$ e $p=0,01$, respectivamente). A interação significativa entre sexo e atividade total indicou que os efeitos da atividade total nos perfis de locomoção foram influenciados pelo sexo das ninfas.



RDA1: Encompasses 98.09% out of the 45.32% variance constrained by the proposed variables.
 RDA2: Encompasses 1.52% out of the 45.32% variance constrained by the proposed variables.

Figura 10. Biplot de análise de redundância (RDA) considerando fatores biológicos. O gráfico da RDA mostra como as ninfas machos e fêmeas se dispersaram ao longo dos eixos. As dissimilaridades do perfil de locomoção foram restringidas por variáveis explicativas, responsáveis pela atividade total, sexo e perfis de expressão dos genes *Rpfor*. No total, 45,32% da variação dentro da matriz é impulsionada pelas variáveis propostas. Desse total, 98,09% da variância restrita é resolvida ao longo do eixo horizontal (RDA1), enquanto 1,52% é resolvida ao longo do eixo vertical (RDA2).

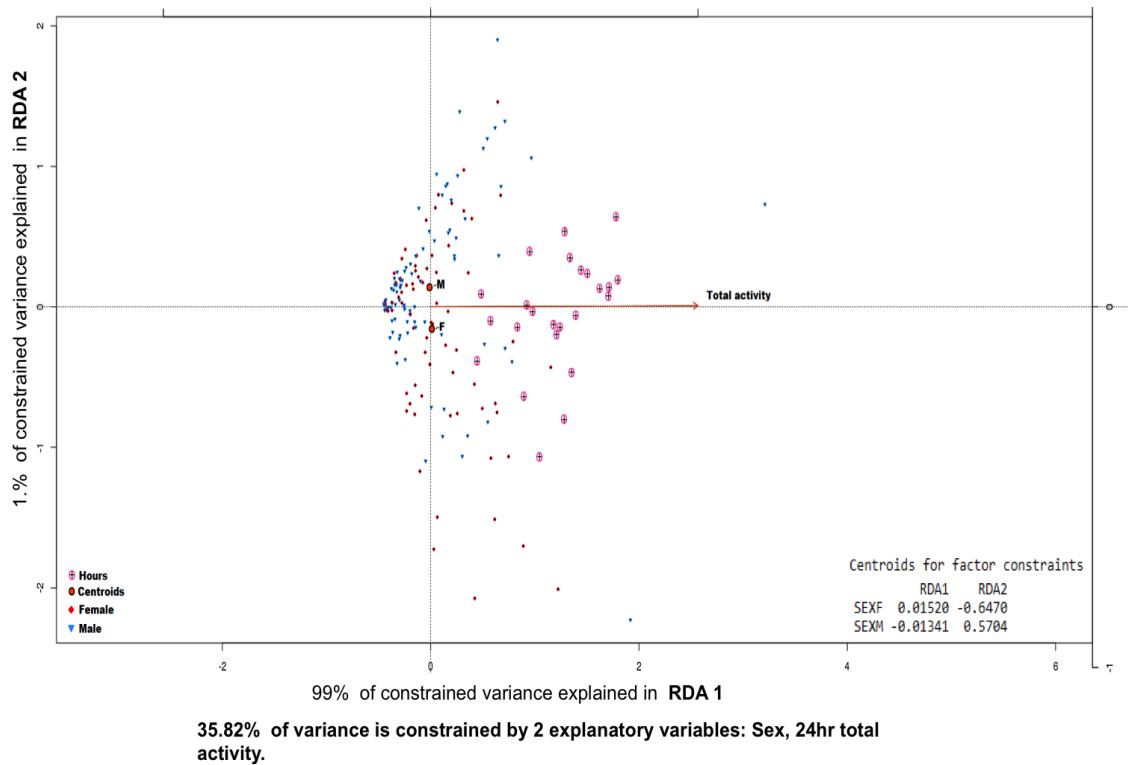


Figura 11. Análise de redundância (RDA) considerando efetores biológicos. A RDA mostra como as ninfas machos e fêmeas se dispersam ao longo dos eixos. As dissimilaridades do perfil de locomoção são limitadas por variáveis explicativas que explicam o sexo e a contagem total de atividades em 24h. No total, 35,82% da variação dentro da matriz é impulsionada pelas variáveis propostas. A partir disso, 99% da variância restrita é explicada pelas correlações e interações ao longo do eixo horizontal (RDA1).

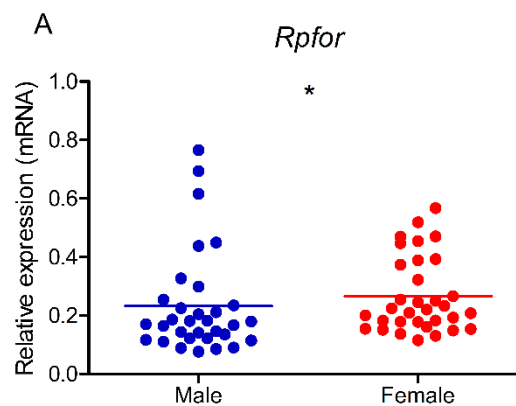


Figura 12. Comparação da expressão relativa dos genes *Rpfpr* entre ninfas de *R. prolixus* machos (azul) e fêmeas (vermelho). Cada símbolo representa a expressão

relativa do gene *Rpfor* determinado para o corpo gorduroso de um indivíduo. Linhas horizontais representam a mediana de cada grupo. Teste de Mann Whitney; * $p=0,019$.

Tabela 1. Análise multivariada permutacional não paramétrica de variância.

Fator	DF	R ²	F	Pr(>F)	
Atividade Total	1	0,5455	93,842	0,001	**
Sexo	1	0,0294	5,059	0,004	**
<i>Rpfor</i>	1	0,0424	7,305	0,005	**
Sexo: <i>Rpfor</i>	1	0,0083	1,439	0,200	
Sexo: Atividade Total	1	0,0287	4,948	0,011	*
<i>Rpfor</i> : Atividade Total	1	0,0083	1,427	0,215	
Residual	58	0,3371			

Significado dos símbolos: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Fórmula avaliada = matrix65v24 ~ (((Sexo * *Rpfor*)) + (Sex * Total_activity) + (*Rpfor* * Atividade_total)), data = dummy65iexp, permutations = 999, method = "euclid", by = "terms").

Como a atividade total dos insetos foi o principal fator que influenciou os diferentes perfis de locomoção, nós então testamos se os níveis de atividade foram afetados pela expressão gênica e pelo sexo. Encontramos um efeito significativo do sexo e da expressão de *Rpfor* na atividade total dos insetos (Tabela 2; GLM-ANOVA, $p<0,0001$ para ambos os parâmetros). A interação significativa entre sexo e expressão de *Rpfor* (Tabela 2; GLM-ANOVA, $p<0,0001$) indicou que os efeitos da expressão de *Rpfor* nos níveis de atividade total foram fortemente afetados pelo sexo das ninfas. Além disso, testamos se a atividade total e a expressão gênica estavam correlacionadas em cada um dos sexos. Uma correlação positiva, mas não significativa, foi observada entre a atividade total e a expressão de *Rpfor* nas ninfas fêmeas (correlação de Spearman, $rS= +0,32$; $p=0,067$). Interessantemente, o teste detectou uma correlação negativa significativa entre a atividade total individual das ninfas machos e a expressão de *Rpfor* (correlação de Spearman, $rS=-0,67$; $p>0,0001$).

Tabela 2. Análise GLM dos efeitos da expressão de *Rpfor* e sexo na atividade cumulativa de ninfas de *R. prolixus*.

	Estimado	Erro padrão	Valor Z	Pr(>z)	
(Intercept)	5,4849	0,0217	252,60	<2e-16	***
Sexo	1,8700	0,0279	66,95	<2e-16	***
<i>Rpfor</i>	1,4693	0,0676	21,73	<2e-16	***
Sexo: <i>Rpfor</i>	-7,3204	0,1237	-59,16	<2e-16	***

Significado dos símbolos: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0.

Fórmula avaliada = glm(formula = Atividade total ~ Sexo * *Rpfor*, family = poisson())

4.3. Confirmação do silenciamento dos genes *Rpfor* e *RpNPF* através da técnica de RNAi

Para padronizar as condições de silenciamento do gene *Rpfor*, inicialmente foram testadas duas diferentes concentrações do inóculo de dsRNA, 5 e 10 µg (Figura 13). Sete dias após a inoculação, a expressão relativa do gene no cérebro dos insetos foi reduzida em 83 e 84% para insetos inoculados com 5 10 µg de dsRNA respectivamente (Figura 13, Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). A redução da expressão se manteve em 87 e 89% após 52 dias do inóculo, quando os insetos apresentavam um jejum de 30 dias (Figura 13, Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).

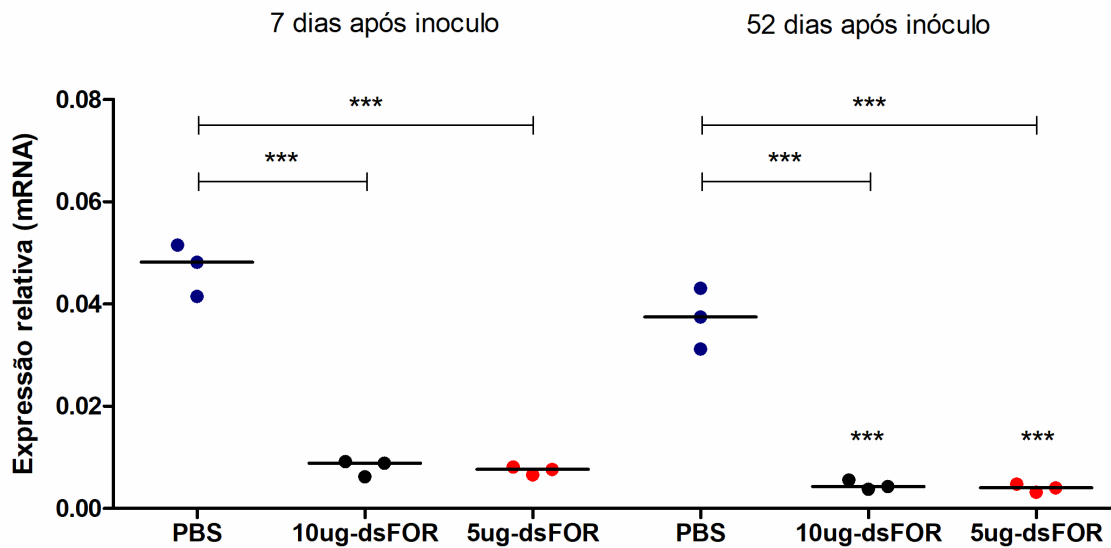


Figura 13. Expressão relativa do gene *Rpfor* no cérebro de insetos controle (inoculados com PBS) e silenciados (inoculados com 5 e 10 μ g de dsFOR). Cada ponto corresponde à expressão relativa de uma amostra contendo cinco cérebros. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=3 amostras por tratamento; Kruskal-Wallis *** p <0,001).

Uma vez que a RDA mostrou que o sexo das ninfas pode influenciar nos perfis de atividade locomotora, um novo ensaio de silenciamento foi realizado utilizando-se uma concentração de 5 μ g de dsFOR em ninfas sexadas. A análise da RTqPCR mostrou uma redução significativa na expressão relativa do gene *Rpfor* no cérebro de ninfas machos e fêmeas quando comparado aos controles (PBS e dsKER) (Figura 14A e B; ANOVA p <0,0001, para os dois sexos). A redução na expressão do gene dos insetos silenciados em relação a dos insetos inoculados com PBS foi de 88,5 e 84,3% para machos e fêmeas, respectivamente. Nós também avaliamos a expressão relativa do gene no corpo gorduroso das ninfas silenciadas, uma vez que existem trabalhos que sugerem uma relação entre a expressão do gene *foraging* e o metabolismo de lipídeos (Kaun, Chakaborty-Chatterjee & Sokolowski, 2008; Toth & Robinson, 2005) (Figura 15). Da mesma forma que o observado para o cérebro, uma redução significativa na expressão relativa do gene *Rpfor* foi observada no corpo gorduroso de ninfas machos e fêmeas (Figuras 15A e B; ANOVA p =0,001 e Kruskal-Wallis p <0,0001, respectivamente). A redução na expressão do gene *Rpfor* nesse órgão foi de 82,6% para os machos e de 94,7% para as fêmeas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na

expressão do gene em ninfas machos inoculadas com PBS ou dsKER em nenhum dos dois tecidos (Figuras 14A e 15A; Kruskal-Wallis, n.s.). Entretanto, as ninfas fêmeas inoculadas com dsKER apresentaram níveis de expressão mais elevados do que aquelas inoculadas com PBS tanto no cérebro (Tukey $*p=0,01$) quanto no corpo gorduroso (Dunn $*p=0,01$).

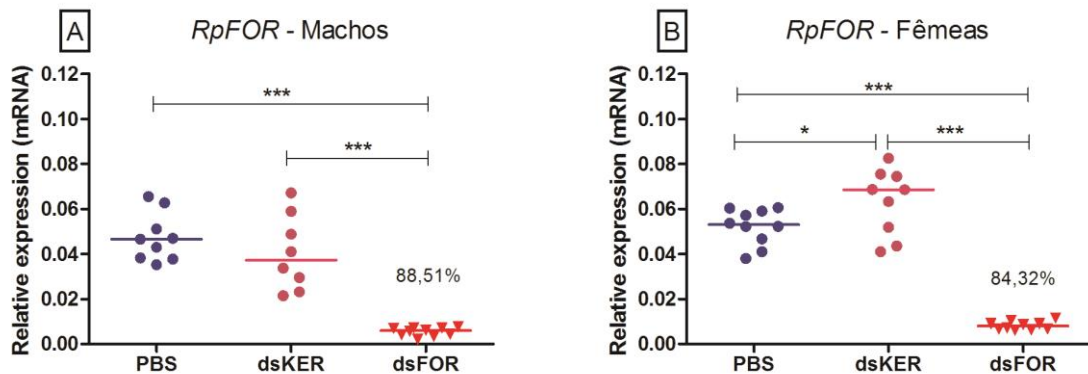


Figura 14. A expressão relativa do gene *Rpfor* é diminuída no cérebro de insetos inoculados com dsFOR. A. Expressão relativa do gene *Rpfor* no cérebro de ninfas machos controle (inoculadas com PBS e dsKER) e inoculadas com dsFOR (Tukey $***p<0,0001$ para todas as comparações). B. Expressão relativa do gene *Rpfor* no cérebro de ninfas fêmeas controle (inoculadas com PBS e dsKER) e inoculadas com dsFOR (Dunn $*p=0,01$ $***p<0,0001$). Cada ponto corresponde à expressão relativa do corpo gorduroso de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=8-10 insetos por tratamento).

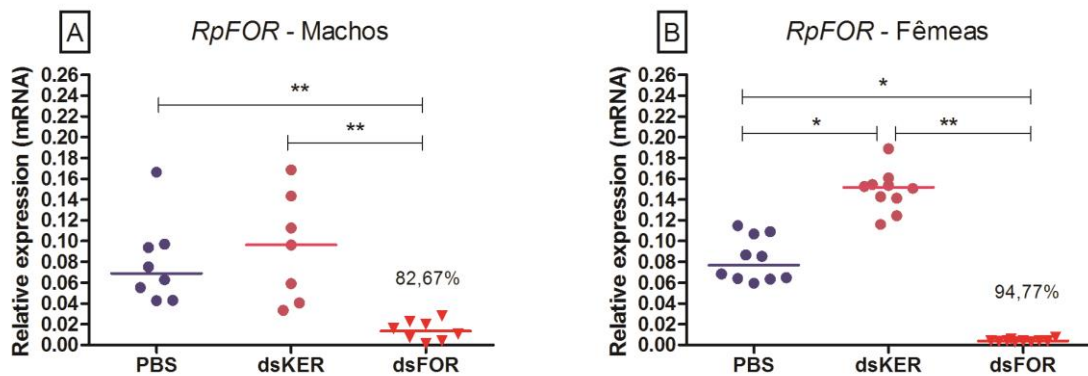


Figura 15. A expressão relativa do gene *Rpfor* é diminuída no corpo gorduroso de insetos inoculados com dsFOR. A. Expressão relativa do gene *Rpfor* no corpo gorduroso de ninfas machos controle (inoculadas com PBS e dsKER) e inoculadas com dsFOR (Tukey $**p < 0,001$ para todas as comparações). B. Expressão relativa do gene *Rpfor* no corpo gorduroso de ninfas fêmeas controle (inoculadas com PBS e dsKER) e inoculadas com dsFOR (Tukey $*p = 0,01$ $**p < 0,001$). Cada ponto corresponde à expressão relativa do corpo gorduroso de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=8-10 insetos por tratamento).

Como o NPF é um neuropeptídeo, nós somente avaliamos a expressão do gene no cérebro das ninfas silenciadas. Para as ninfas inoculadas com dsNPF também foi observada uma redução significativa na expressão do gene *RpNPF* em relação aos controles em ambos os sexos (Figura 16; Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$ para machos e ANOVA, $p < 0,0001$ para fêmeas). A redução na expressão relativa do gene nas ninfas silenciadas foi de 93,1 e 87,34% para machos e fêmeas, respectivamente. Para ambos os sexos, não foram observadas diferenças na expressão do gene entre ninfas inoculadas com PBS ou dsKER (Kruskal-Wallis, n.s.).

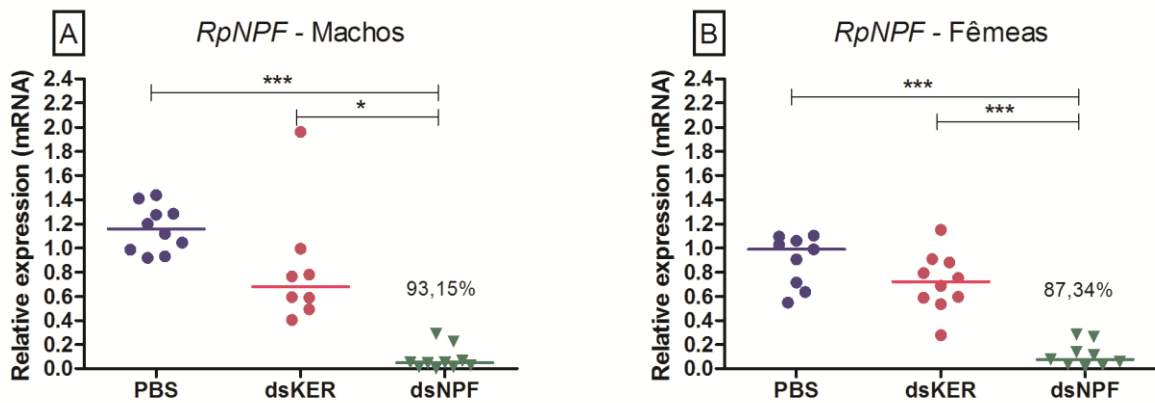


Figura 16. A expressão relativa do gene *RpNPF* é diminuída no cérebro de insetos inoculados com dsNPF. A. Expressão relativa do gene *RpNPF* no cérebro de ninfas machos controle (inoculadas com PBS e dsKER) e inoculadas com dsFOR (Dunn * $p=0,01$ *** $p<0,0001$). B. Expressão relativa do gene *RpNPF* no cérebro de ninfas fêmeas controle (inoculadas com PBS e dsKER) e inoculadas com dsFOR (Tukey *** $p<0,0001$ para todas as comparações). Cada ponto corresponde à expressão relativa do corpo gorduroso de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo ($n=7-10$ insetos por tratamento).

Nós também avaliamos se a expressão do gene *Rpfor* poderia ser afetada em ninfas silenciadas para o gene *RpNPF* e vice-versa. Como pode ser observado na Figura 17 não foram observadas diferenças para ninfas machos e fêmeas em nenhuma das comparações com os grupos controle (Mann-Whitney, n.s.).

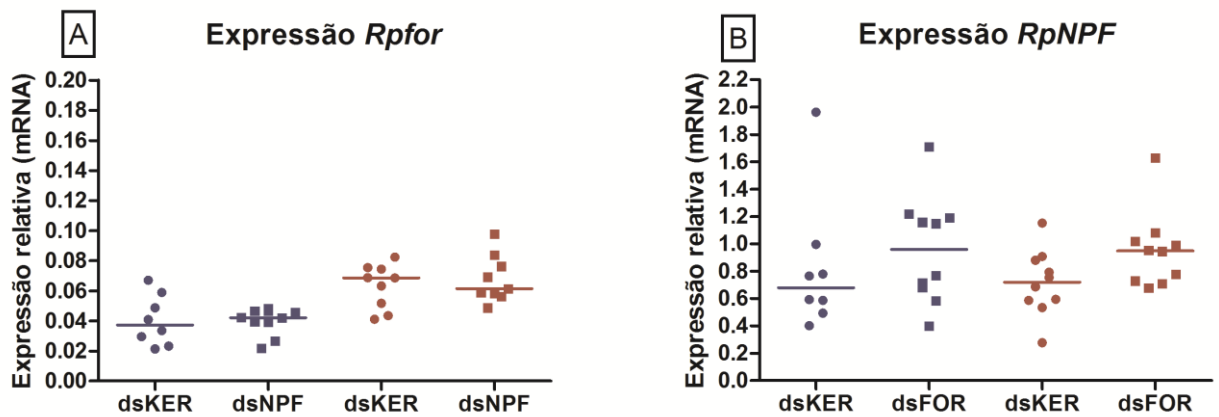


Figura 17. O silenciamento do gene *Rpfors* não modifica a expressão do gene *RpNPF* e vice-versa em ninfas de *R. prolixus*. A. Expressão relativa de *Rpfors* em ninfas machos (azul) e fêmeas (vermelho) silenciadas para o gene *RpNPF*. B. Expressão relativa de *RpNPF* em ninfas machos (azul) e fêmeas (vermelho) silenciadas para o gene *Rpfors*. Cada ponto corresponde à expressão relativa do cérebro de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=8-10 ninfas por tratamento; Mann-Whitney, n.s.).

4.4. Avaliação in vivo da função do gene *foraging* através do silenciamento por RNAi

Nossos resultados mostraram uma redução significativa na expressão dos genes *Rpfors* e *RpNPF* em insetos inoculados por dsRNAs específicos, que se mantêm por períodos prolongados. Uma vez que os genes *foraging* e *npf* têm sido relacionados à modulação da atividade locomotora no contexto de busca por alimento em outros grupos de invertebrados, nós realizamos diferentes ensaios biológicos para avaliar uma possível participação desses genes em processos comportamentais e fisiológicos relacionados à locomoção, busca por hospedeiros, alimentação e acumulação de reservas energéticas.

4.4.1. Atividade locomotora não orientada

A avaliação da atividade locomotora de ninfas previamente silenciadas para o gene *Rpfors* e com ~30 dias de jejum mostrou que houve uma redução nos níveis de atividade durante os dois picos do ciclo diário (Figura 18). O grupo de insetos inoculados com dsKER apresentou atividade semelhante à do controle (inoculados

com PBS). Diferentemente, a atividade locomotora de ninfas previamente silenciadas para o gene *RpNPF* não foi alterada durante o período de 24 h de avaliação (Figura 19).

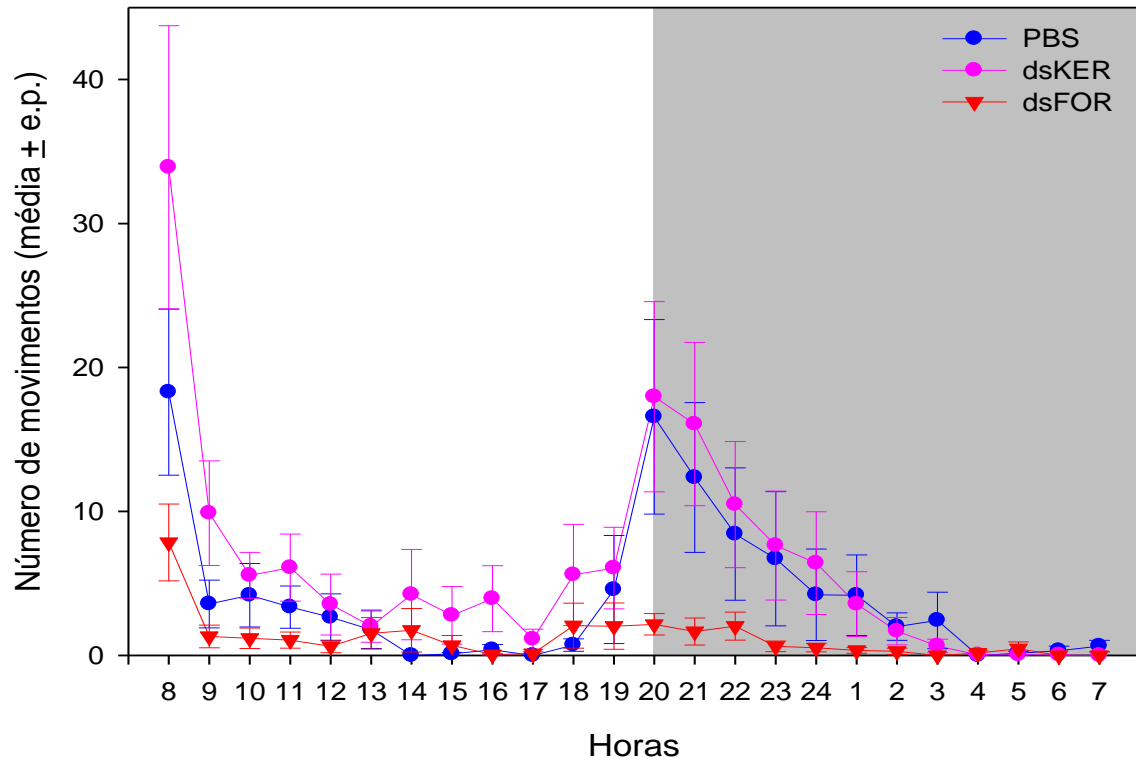


Figura 18. O silenciamento do gene *Rpfor* diminui a atividade locomotora não orientada de ninfas de *Rhodnius prolixus*. As áreas cinza e branca representam a escotofase e fotofase, respectivamente (n=30 insetos por tratamento).

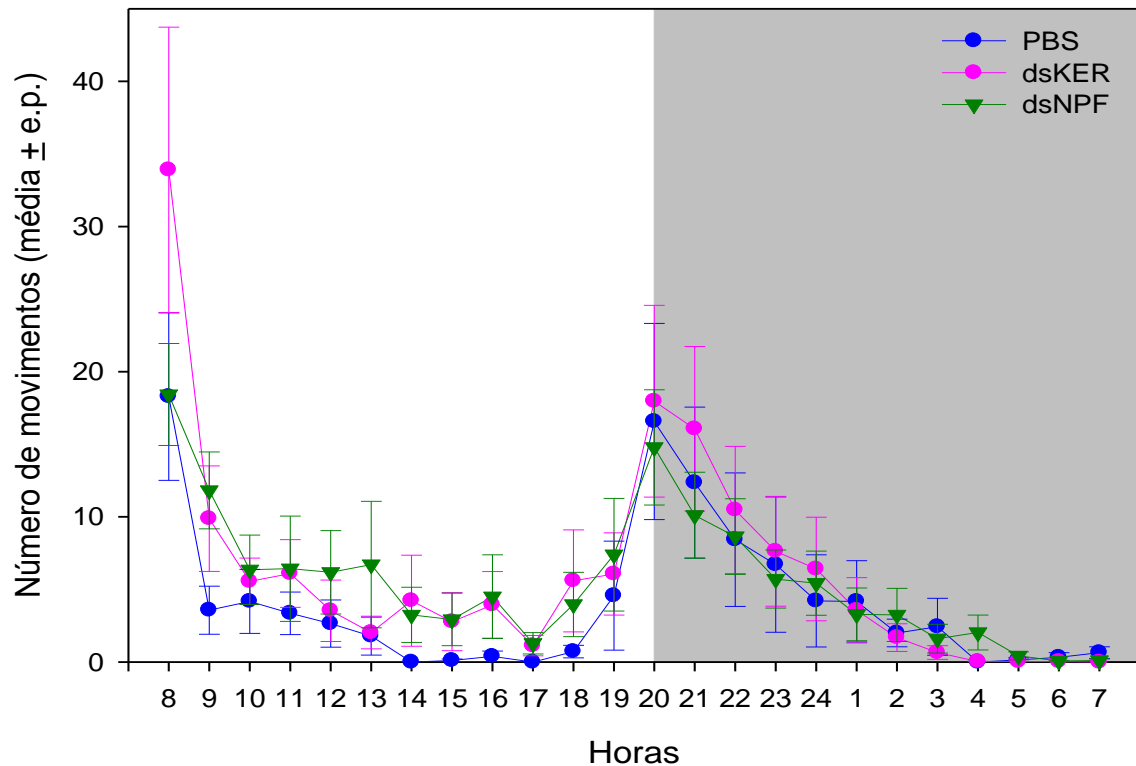


Figura 19. O silenciamento do gene *RpNPF* não altera a atividade locomotora de ninfas de *R. prolixus*. As áreas cinza e branca representam a escotofase e fotofase, respectivamente (n=30 insetos por tratamento).

4.4.2. Saída do abrigo na presença de pistas do hospedeiro

Para avaliar o comportamento de saída do abrigo na presença de sinais do hospedeiro, ninfas silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* e seus respectivos controles foram liberadas em uma arena contendo um refúgio artificial, e uma vez dentro dele, foram desafiadas com a introdução de um hospedeiro na arena. Nas cinco repetições realizadas 57 ± 8 e $65 \pm 6\%$ das ninfas inoculadas com PBS e dsKER, respectivamente, $92 \pm 3\%$ das inoculadas com dsFOR e $83 \pm 5\%$ daquelas inoculadas com dsNPF foram capturadas nas fitas presas ao frasco que continha o hospedeiro. Os resultados mostraram que o silenciamento do gene *Rpfor* promoveu um aumento da saída de ninfas do abrigo (Kruskal-Wallis, $p=0,01$) enquanto que o do gene *RpNPF* não mostrou alterações entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, n.s.).

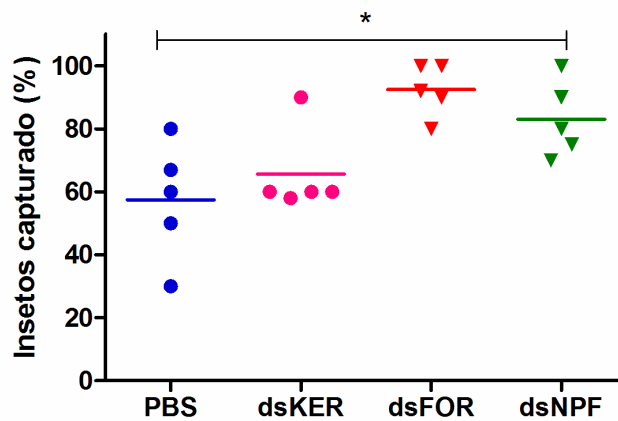


Figura 20. O silenciamento do gene *Rpfor* aumenta o comportamento de busca por hospedeiro em ninfas de *R. prolixus* em jejum (Dunn, * $p=0,01$). Cada ponto corresponde a porcentagem de ninfas capturadas próximo ao hospedeiro em um ensaio. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo ($n=5$ ensaios).

4.4.3. Comportamento alimentar

As taxas de ingestão de sangue de coelho citratado, oferecido em alimentador artificial, foram comparadas entre insetos silenciados e seus controles. Não foram observadas diferenças para nenhum dos genes quando as ninfas fêmeas foram comparadas (Figura 21A; Kruskal-Wallis, n.s. para todas as comparações). Entretanto, houve uma redução significativa nas taxas de ingestão de ninfas machos quando silenciadas para o gene *RpNPF* (Figura 21B; ANOVA, n.s. para dsFOR, $p=0,04$ para dsNPF).

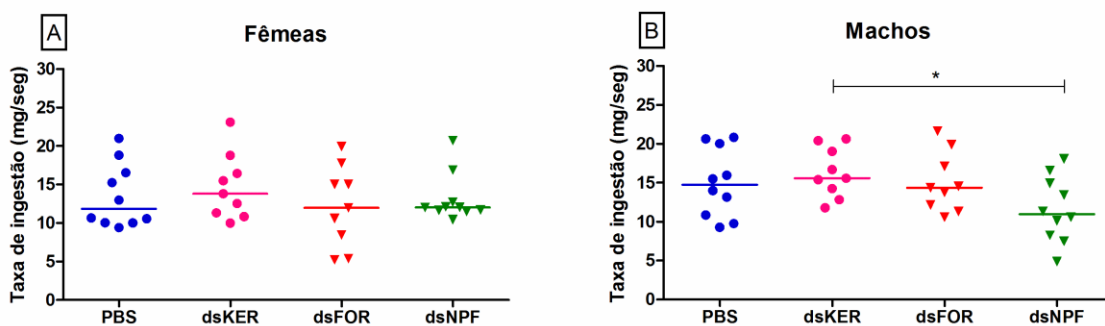


Figura 21. As taxas de ingestão de sangue são reduzidas em ninfas machos de *R. prolixus* silenciadas para o gene *RpNPF*. A. Taxas de ingestão sanguínea de ninfas fêmeas silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* ($n=9-10$ ninfas por tratamento;

Kruskal-Wallis, n.s. para todas as comparações). B. Taxas de ingestão sanguínea de ninfas machos silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* (n=9-10 ninfas por tratamento; ANOVA, n.s. para dsFOR, Tukey *p<0,05 para dsNPF). Cada ponto corresponde ao dado de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=9-10 insetos por tratamento).

4.4.4. Quantidade de triglicerídeos no corpo gorduroso de ninfas em jejum

A comparação da quantificação de triglicerídeos no corpo gorduroso de ninfas em jejum não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 22; ANOVA, n.s.).

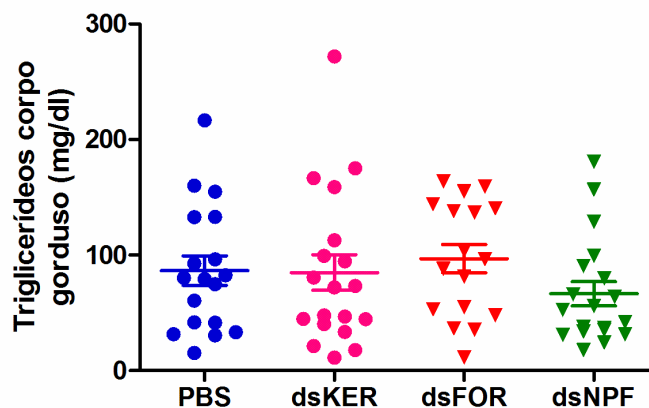


Figura 22. A quantidade de triglicerídeos estocados no corpo gorduroso não é alterada em ninfas de *R. prolixus* silenciadas para os genes *Rpfor* e *RpNPF* (n=17-19 ninfas por tratamento; ANOVA, n.s. para todas as comparações). Cada ponto corresponde à quantificação total de triglicerídeos normalizada pelo peso do corpo gorduroso de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=18-20 insetos por tratamento).

4.4.5. Quantidade de triglicerídeos e açúcares na hemolinfa

Da mesma forma que o observado para o corpo gorduroso, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos quando a quantidade de triglicerídeos foi quantificada na hemolinfa de ninfas alimentadas (Figura 23A; Kruskal-Wallis, n.s.

para todas as comparações). Com relação à quantidade de açúcares totais na hemolinfa, não foram observadas alterações nas ninfas silenciadas para o gene *Rpfor* (Figura 23B; ANOVA, n.s.). Entretanto, o silenciamento do gene *RpNPF* promoveu um aumento significativo nas quantidades de açúcares presentes na hemolinfa (Figura 23B; ANOVA, $p=0,02$)

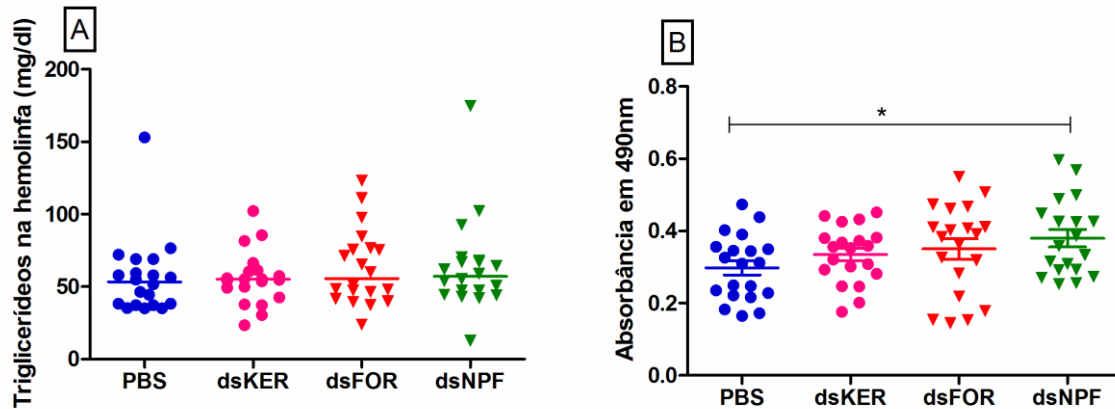


Figura 23. A quantidade de açúcares totais é aumentada em ninfas de *R. prolixus* silenciadas para o gene *RpNPF*. A. Quantificação de triglicerídeos na hemolinfa (Kruskal-Wallis, n.s). B. Quantificação de açúcares totais na hemolinfa (Tukey, $*p < 0,05$). Cada ponto corresponde à quantificação de um indivíduo. As linhas verticais correspondem às medianas de cada grupo (n=19-20 insetos por tratamento).

5. DISCUSSÃO

Os insetos avaliados no presente estudo mostraram dois picos de atividade, um no início da escotofase e outro no início da fotofase, conforme já relatado na literatura (Guarneri *et al.*, 2003; Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998; Marlière *et al.*, 2015). Cerca de metade de todos os eventos de locomoção se concentraram nas primeiras horas da escotofase. No entanto, a comparação dos movimentos realizados em cada hora ao longo do dia mostrou perfis de atividades claramente distintos, ocultos pelos métodos tradicionais de representação usados para analisar a locomoção de insetos. O agrupamento hierárquico dividiu o grupo inicial em três ramos principais como resultado dos níveis de atividade registrados. Como esperado, os insetos mais ativos apresentaram as maiores diferenças. Curiosamente, a posição de agrupamento desses indivíduos muito ativos no dendrograma em relação aos perfis de atividades baixas e médias sugere que as diferenças nos perfis locomotores podem ser determinadas por outros fatores, além da intensidade da atividade.

Como esperado, a análise de redundância (RDA) revelou que a fase do dia foi o principal fator que influenciou os níveis de atividade. Interessantemente, duas características desconhecidas dos padrões locomotores de *R. prolixus* foram reveladas pela aplicação dessa análise. Primeiramente, determinamos que as populações são compostas por indivíduos que apresentam níveis diferenciados de atividade, conforme mostrado nos três principais ramos criados pelo dendrograma. Nos extremos, encontramos que aproximadamente 7% das ninfas não se movimentaram durante as 24h registradas, enquanto outros 3% produziram mais de mil eventos de movimento no mesmo intervalo. Esses perfis de atividade muito diferentes, que somam 10% dos indivíduos avaliados, podem representar estratégias coexistentes de investimento em energia na população e sua relevância ecológica merece ser estudada. Cenários de escassez nutricional são comuns nos ecótopos silvestres dos triatomíneos (Noireau & Dujardin, 2001; Sarquis *et al.*, 2010). Sob tais circunstâncias, a presença de indivíduos com níveis baixos de atividade e, conseqüentemente menor consumo de reservas de energia, poderia ser vantajosa enquanto se espera que uma fonte de sangue chegue ao ecótopo. Como estratégia alternativa, a existência de indivíduos com locomoção intensa e talvez, maior capacidade de dispersão, poderia resolver ativamente a escassez nutricional,

mesmo com um aumento dos riscos de predação induzidos pela exposição fora dos abrigos.

Uma segunda característica encontrada foi a presença de indivíduos com níveis de atividade semelhantes, mas agrupados separadamente de acordo com as diferenças em seus perfis temporais. Isso significa que seus principais eventos de locomoção foram observados em diferentes fases do ciclo diário. Para explorar o conjunto de dados com mais detalhes, decidimos focar na expressão da atividade durante a fotofase. Para evitar considerar a atividade pertencente às caudas dos picos principais, foram excluídas deste cálculo as duas horas após o acender das luzes e antes do apagar das luzes. Nós encontramos que 21,9% dos insetos estavam ativos durante metade das horas do intervalo restante. Além disso, 1,8% desses insetos se movimentou em todas as horas da fotofase. Essa extensão temporal da atividade locomotora não orientada também poderia ser vantajosa em um cenário de escassez nutricional, já que alguns indivíduos se tornariam ativos fora do horário convencional de forrageamento aumentando as chances de encontro de hospedeiro. É importante ressaltar que esse não é o perfil de locomoção predominante nos triatomíneos, o que pode dever-se ao fato de que estar ativo durante outras janelas temporais aumenta o risco de predação. Também é importante mencionar que esse experimento foi realizado com indivíduos que não tinham acesso a abrigos e a possibilidade de interagir com co-específicos. De acordo com nosso conhecimento atual sobre o uso de abrigos por triatomíneos, a maioria dos indivíduos tende a se manter agrupada em refúgios durante a noite e apenas uma pequena fração deles sai espontaneamente dos locais protegidos (Ferreira, Guarneri & Lorenzo, 2019; Lorenzo & Lazzari, 1998). Nesse sentido, estudos futuros são necessários para determinar se os insetos que deixam os abrigos pertencem a algum dos diferentes perfis de atividades encontrados no presente trabalho. Para confirmar a existência de indivíduos ativos durante o dia, deve-se também avaliar a dinâmica do uso de abrigos durante a escotofase, tanto na presença quanto na ausência de pistas do hospedeiro.

Nossos resultados também sugerem a existência de perfis comportamentais sexo-específicos, expressos por ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus*. Padrões de locomoção sexualmente dimórficos já foram relatados para moscas domésticas e *Drosophila melanogaster* (Bahrndorff *et al.*, 2012; Belgacem & Martin, 2002; Buchan

& Sohal, 1981; Helfrich-Förster, 2000; Martin *et al.*, 1999; Ragland e Sohal 1973). O mesmo acontece com triatomíneos, onde se mostrou que a locomoção de insetos adultos difere de acordo com o sexo, com os machos respondendo ativamente a sinais sexuais, enquanto as fêmeas não respondem (Manrique & Lorenzo, 2012). A motivação para sair dos abrigos também é notavelmente diferente para machos e fêmeas. Pontes e colaboradores (2014) mostraram que uma proporção relevante de fêmeas adultas deixa os abrigos espontaneamente e se envolve na busca ativa do hospedeiro, mesmo na ausência de pistas. A presença de machos no mesmo ambiente não altera esse perfil (Pontes *et al.*, 2014). Por outro lado, odores emitidos por fêmeas promovem a ativação e orientação de machos adultos que, de outra forma, não parecem deixar abrigos (Pontes *et al.*, 2014). Este é o primeiro estudo que relata perfis de atividade locomotora sexo-específicos em triatomíneos imaturos. Como mencionado, os insetos não foram expostos a estímulos ou co-específicos associados ao abrigo, o que induziria acinesia e comportamento de agregação. Estudos adicionais devem esclarecer se estas diferenças sexo-específicas na atividade locomotora que são expressas pelas ninfas podem estar relacionadas à busca de sinais sexuais por insetos machos.

De acordo com a RDA, a expressão de *Rpfor* influenciou significativamente os perfis de atividade locomotora não orientada, sugerindo que o gene está implicado na modulação desse comportamento. Além disso, descobrimos que o gene *Rpfor* afeta a atividade total dos insetos de maneira dependente do sexo. De fato, a expressão do gene *Rpfor* foi inversamente correlacionada com o vetor de atividade total no sexo masculino, o que sugere que uma diminuição na expressão de *Rpfor* provavelmente induziria a um aumento da atividade locomotora das ninfas do sexo masculino. No entanto, vale ressaltar que estudos desenvolvidos com outras espécies/modelos de insetos estabeleceram que a função do gene *foraging*, como o nome indica, está relacionada à modulação dos níveis de atividade no contexto da busca de alimentos. Em *Drosophila*, por exemplo, o aumento da expressão induz a um aumento na distância percorrida pela larva na presença de comida e na ingestão do alimento (Allen *et al.*, 2017; Osborne *et al.*, 1997). Nas abelhas, as diferenças nos níveis de abundância do RNA do gene *Amfor* e na atividade de PKG têm sido implicadas na transição das operárias de enfermeiras (que distribuem os alimentos dentro da colmeia) para forrageiras (que buscam comida fora da colmeia) (Ben-

Shahar, 2005). Como já mencionado, correlações positivas (Ben-Shahar, 2005; Lucas *et al.*, 2010; Pereira & Sokolowski, 1993; Tobbach *et al.*, 2011) e inversas (Ingram, Oefner & Gordon, 2005, Tobbach *et al.*, 2008) entre a expressão do gene *foraging* e a atividade locomotora foram demonstradas, sugerindo que diferentes vias conectam os níveis de expressão desse gene aos fenótipos de forrageamento nas diferentes espécies de insetos. O gene *foraging*, por ser um gene pleiotrópico, provavelmente tem funções diferentes em diversas células e órgãos.

Como já mencionado, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que modulam o comportamento dos triatomíneos. Uma vez que encontramos uma possível relação entre atividade locomotora não orientada e a expressão do gene *Rpfor*, o próximo passo foi tentar avaliar sua função promovendo seu silenciamento através da técnica de RNAi. Decidimos incluir o gene *RpNPF* nos experimentos uma vez que existem dados na literatura sugerindo a sua participação na modulação da expressão do *Rpfor* (Francis *et al.*, 2010). Os dois genes codificam proteínas com funções previamente caracterizadas em diversas espécies de insetos (Pereira & Sokolowski, 1993; Sandman, 1999; Ben-Shahar, 2005; Ingram, Oefner & Gordon, 2005; Tobbach *et al.*, 2008; Ament, Velarde, Kolodkin, Moyse & Robinson, 2011), fator que facilita a avaliação fenotípica promovida por seus silenciamentos. *R. prolixus* é um excelente modelo para utilização da técnica de silenciamento por RNAi, uma vez que, dependendo do gene, a expressão pode se manter reduzida por mais de sete meses passando por todas as fases de desenvolvimento do inseto sem necessidade de novas aplicações de dsRNA (Paim *et al.*, 2013). No presente estudo, silenciamos ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* e analisamos os níveis de mRNA dos genes específicos quando os insetos estavam recém inoculados (7 dias pós-inóculo de dsRNA) e depois de mudarem para o quinto estágio (52 dias pós-inóculo) e constatamos que obtivemos um silenciamento eficiente e persistente.

A expressão relativa do gene *Rpfor* de insetos silenciados quando comparada com insetos do grupo controle foi superior a 80% independentemente do sexo e do tecido avaliado. Um aumento significativo nos níveis de mRNA do gene *Rpfor* foi observado nas ninfas fêmeas inoculadas com o dsRNA inespecífico em comparação com aquelas inoculadas com PBS. Esse aumento, entretanto, não promoveu diferenças significativas em nenhuma das avaliações fenotípicas. Os ensaios de avaliação da expressão do gene *Rpfor* ao longo de diferentes estados fisiológicos

dos insetos mostraram que o gene mantém uma expressão baixa no cérebro das ninfas que ainda sofre uma redução de cerca de 30% após a alimentação. Já a expressão do gene no corpo gorduroso de insetos em jejum é cerca de 30 vezes mais alta do que a encontrada no cérebro nesse mesmo estado nutricional. Interessantemente, os níveis de expressão do gene no corpo gorduroso caem abruptamente logo após a alimentação, chegando a níveis semelhantes aos encontrados no cérebro cinco dias depois. O silenciamento, avaliado em insetos com ~30 dias de jejum, reduziu a expressão do gene a níveis semelhantes aos observados em insetos alimentados e não silenciados.

Os dois ensaios que avaliaram a atividade dos insetos silenciados mostraram diferenças significativas destes em relação aos seus controles. O primeiro ensaio, que avaliou a atividade locomotora não orientada, mostrou que os insetos silenciados reduziram a atividade especialmente durante as primeiras horas da escotofase. No segundo ensaio, que avaliou a saída do abrigo na presença de pistas do hospedeiro, os insetos silenciados foram capturados junto ao hospedeiro com uma maior frequência do que os controles. Em um estudo prévio mostramos que ninfas de *R. prolixus* infectadas por *T. cruzi* diminuem a atividade locomotora não orientada durante o período da escotofase relacionado com a busca de hospedeiro (Marlière *et al.*, 2015). Interessantemente, as ninfas infectadas saem do abrigo em proporções similares às dos controles na presença de pistas do hospedeiro (Marlière, 2015). Vários trabalhos sugerem que a infecção por *T. cruzi* reduz as reservas nutricionais do vetor (Juarez, 1970; Schaub, 1989; Kollien & Schaub, 1998; Botto-Mahan *et al.*, 2008) o que faria com que insetos infectados apresentassem uma deficiência nutricional em relação a coespecíficos com níveis semelhantes de jejum. Com base nisso, sugerimos que insetos infectados se locomoveriam menos na ausência de pistas do hospedeiro como estratégia para evitar a perda de recursos nutricionais, já reduzidos, na ausência de sinais robustos que confirmem a presença de um hospedeiro. A presença dessas pistas promoveria então o aumento na saída dos abrigos. A semelhança dos resultados encontrados entre os insetos silenciados para o gene *Rpfor* com aqueles mostrados para os infectados por *T. cruzi* nos levou a levantar a hipótese de que este gene poderia estar relacionado com a modulação do metabolismo de lipídeos, já sugerida para outros modelos de insetos (Toth & Robison, 2005; Kaun, Chakaborty-Chatterjee & Sokolowski, 2008).

De acordo com essa ideia, os insetos silenciados diminuiriam sua atividade não orientada na ausência de pistas do hospedeiro e aumentariam os níveis de atividade orientada na presença desses sinais em consequência de uma redução das suas reservas nutricionais. Entretanto, a quantificação de triglicerídeos no corpo gorduroso de ninfas em jejum, sabidamente a reserva nutricional mais relevante para insetos (Canavoso *et al.*, 2001), foi semelhante entre as ninfas silenciadas e seus controles. Esses resultados sugerem que o gene *Rpfor* não participa dos processos de acumulação de lipídeos em *R. prolixus*. Para confirmar essa hipótese, entretanto, ainda é necessário avaliar se as quantidades de triglicerídeos também são semelhantes nos insetos alimentados. O gene *Rpfor* também parece não estar envolvido na eficiência dos insetos em obter sangue, uma vez que não encontramos diferenças nas taxas de ingestão sanguínea de insetos silenciados e seus controles.

As reservas nutricionais acumuladas no corpo gorduroso sob a forma de proteínas, lipídeos e carboidratos (Arrese & Soulages, 2010) são disponibilizadas na hemolinfa conforme as necessidades fisiológicas do inseto. Em triatomíneos adultos, no caso dos lipídeos, as reservas começam a ser utilizadas quando o intestino está quase vazio e a digestão está próxima do fim (Pontes *et al.*, 2008). Sob condições de demanda de energia, o hormônio adipocinético é liberado da corpora cardíaca para a hemolinfa e chega até seus receptores que são expressos nas células do corpo gorduroso. Isso promove a quebra de triglicerídeos e glicogênio, e leva à produção e liberação de carboidratos (glicose e trealose), lipídeos e prolina circulantes (revisado por Lorenz & Gäde 2009). O hormônio adipocinético também tem sido associado à modulação da atividade locomotora em insetos em jejum (Lee & Park, 2004; Isabel *et al.*, 2005), o que faz dele um candidato interessante para ser avaliado em estudos futuros. Pensando na disponibilização das reservas nutricionais, nós avaliamos a quantidade de triglicerídeos e de açúcares totais presentes na hemolinfa dos insetos. Os resultados mostraram não haver diferenças entre ninfas silenciadas e seus controles. Entretanto, é importante ressaltar que devido a problemas metodológicos não foi possível coletar a hemolinfa das ninfas em jejum. Uma vez que os níveis de expressão do gene *Rpfor* de ninfas silenciadas ficam semelhantes aos de ninfas alimentadas, a ausência de diferenças poderia ser consequência do estado nutricional dos insetos no momento da coleta de hemolinfa. Estudos complementares serão necessários para confirmar esses resultados.

No presente estudo também conseguimos realizar osilenciamento do gene *RpNPF*, que teve sua expressão reduzida em cerca de 90% no cérebro de ninfas machos e fêmeas avaliadas depois de ~52 do inóculo do dsRNA. Além da sua possível participação nas vias que promovem a expressão do gene foraging (Francis *et al.*, 2010), o gene *RpNPF* parece também estar envolvido na regulação da busca e da ingestão de alimentos (Ament, *et al.*, 2011; Sandman, 1999). Para testar a participação desse gene nas vias que regulam a expressão do gene *Rpfor* nós avaliamos a expressão do gene *Rpfor* em ninfas silenciados para o gene *RpNPF* e vice-versa. Entretanto, nenhuma alteração nos níveis de expressão de mRNA foi observada. Esses resultados nos indicam que, pelo menos a nível de modulação gênica, estes genes atuam em vias independentes em *R. prolixus*.

Não encontramos alterações na atividade locomotora de ninfas silenciadas para o gene *RpNPF* tanto na atividade não orientada quanto na orientada a pistas de hospedeiros. Esses resultados diferem de outros modelos de insetos, onde se demonstrou a participação deste gene modulando a atividade locomotora (Hou *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2003; Ament *et al.*, 2011). Da mesma forma, as quantidades de triglicerídeos no corpo gorduroso de ninfas em jejum e na hemolinfa de ninfas alimentadas foram semelhantes para ninfas silenciadas e seus controles. Os resultados sugerem que também este gene não participe diretamente da modulação da produção de reservas nutricionais. Vale lembrar, que da mesma forma que para os ensaios de *Rpfor*, esses resultados ainda precisam ser confirmados pela análise dos níveis de carboidratos no corpo gorduroso de ninfas alimentadas. Interessantemente, os níveis de açúcares totais das ninfas silenciadas para o gene *RpNPF* estavam significativamente aumentados nas ninfas silenciadas. Em adição, a eficiência alimentar das ninfas machos silenciadas foi reduzida em relação à observada nos controles. Essas diferenças pontuais que poderiam estar relacionadas com a já relatada modulação da capacidade de ingestão sanguínea e utilização de reservas nutricionais (Ament, *et al.*, 2011; Sandman, 1999), ainda não nos permitem afirmar nada conclusivo em relação à participação do gene nesses processos, mas se mostram promissoras no sentido do desenvolvimento de experimentos adicionais para avaliar os mecanismos envolvidos.

Em conclusão, este é o primeiro estudo que buscou avaliar mecanismos moleculares para a modulação da locomoção em triatomíneos. Os experimentos

desenvolvidos mostraram a existência de perfis individuais de atividade locomotora que são afetados tanto pelo sexo dos indivíduos, quanto pela expressão do gene *Rpfor*. O silenciamento desse gene confirmou sua participação na modulação da atividade locomotora tanto na ausência como na presença de estímulos emitidos por hospedeiros. Entretanto, estudos adicionais serão necessários para se compreender os mecanismos moleculares pelos quais as alterações comportamentais são induzidas. Finalmente, os resultados dos ensaios realizados com insetos silenciados para o gene *RpNPF* sugerem sua participação em processos relacionados à ingestão de sangue e posterior utilização de reservas nutricionais.

6. CONCLUSÕES

- A variabilidade interindividual é mascarada quando o número médio de movimentos é usado para descrever perfis locomotores, já que padrões de atividade divergentes não são detectados.
- A análise de agrupamento definiu padrões de locomoção distinguíveis que podem representar estratégias divergentes de investimento em energia que coexistem em populações de *R. prolixus*.
- As RDAs identificaram padrões sexo-específicos de locomoção em ninfas imaturas, aparentemente modulados pela expressão diferencial do gene *Rpfor*.
- O silenciamento dos genes *Rpfor* e *RpNPF* promoveram reduções significativas e estáveis nos níveis de mRNA.
- O silenciamento do gene *Rpfor* confirmou sua participação na modulação da locomoção de *R. prolixus*, atuando na atividade locomotora não orientada e na orientada por pistas do hospedeiro.
- O gene *RpNPF* não participa da modulação da locomoção de *R. prolixus*; da mesma forma, não faz parte da regulação das vias de expressão do gene *Rpfor*.
- Os genes avaliados neste trabalho não parecem afetar o armazenamento de lipídeos no corpo gorduroso de *R. prolixus*, e estudos adicionais são necessários para compreender seu papel no metabolismo de reservas nutricionais de triatomíneos.

REFERÊNCIAS

- Allen, A. M. *et al.* Feeding-related traits are affected by dosage of the foraging gene in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 205, n. 2, p. 761-773, 2017.
- Ament, S.A. *et al.* Neuropeptide Y-like signalling and nutritionally mediated gene expression and behaviour in the honey bee. **Insect Molecular Biology**, v. 20, p. 335-345, 2011.
- Anderson, M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, p. 32-46, 2001.
- Anderson, M.J., Walsh, D.C. Permanova, Anosim, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing? **Ecology Monographs**, v. 83, p. 557-574, 2013.
- Arcà, B. *et al.* Positive selection drives accelerated evolution of mosquito salivary genes associated with blood-feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n.1, p. 122-131, 2014.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- Bahrndorff, S. *et al.* The effects of sex-ratio and density on locomotor activity in the house fly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Science**, v. 12, p. 71, 2012.
- Barrozo, R.B., Lazzari, C.R. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. **Chemical Senses**, v. 29, 319-329, 2004.
- Barrozo, R.B., Minoli, S.A., Lazzari, C.R. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 249-254, 2004.
- Becker, A. *et al.* The regulation of trehalose metabolism in insects. **Experientia**, v. 52, p. 5, p. 433-439, 1996.
- Belgacem, Y.H., Martin, J.R. Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy**, v. 99, p. 15154-15158, 2002.
- Bell, A.M. Future directions in behavioural syndromes research. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, p. 755-761, 2006.
- Ben-Shahar, Y. The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. **Journal Comparative Physiology**, v. 191, p. 987-994, 2005.

- Bodin, A. *et al.* Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. **Journal Insect Physiology**, v. 54, p. 1343-1348, 2008.
- Bodin, A., Vinauger, C., Lazzari, C. R. State-dependency of host-seeking in *Rhodnius prolixus*: The post-ecdysis time. **Journal Insect Physiology**, v. 55, p. 574-579, 2009.
- Botto-Mahan, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardo* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. **Acta Tropica**, v.105, n. 2, p. 166-169, 2008.
- Brady, J. Spontaneous, circadian components of tsetse fly activity. **Journal of Insect Physiology**, v.18, n. 3, p. 471-484, 1972.
- Browne, L.B. Regulatory mechanisms in insect feeding. **In Advances in Insect Physiology Academic Press**, v. 11, pp. 1-116, 1975.
- Browne, L. B., & Evans, D. R. Locomotor activity of the blowfly as a function of feeding and starvation. **Journal of Insect Physiology**, v. 4, n. 1, p. 27-37, 1960.
- Buchan, P.B., Sohal, R.S. Effect of temperature and different sex ratios on physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. **Experimental Gerontology**, v. 16, p. 223-228, 1981.
- Bursell, E. Aspects of the metabolism of amino acids in the tsetse fly, *Glossina* (Diptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 9, n. 4, p. 439-452, 1963.
- Chung, B.Y. *et al.* *Drosophila* neuropeptide F signaling independently regulates feeding and sleep-wake behavior. **Cell Reports**, v. 19, p. 2441-2450, 2017.
- Canals, M. *et al.* Preliminary studies on temperature selection and activity cycles of *Triatoma infestans* and *T. spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), Chilean vectors of Chagas' disease. **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 11-17, 1997.
- Canavoso, L.E. *et al.* Fat metabolism in insects. **Annual review of nutrition**, v. 21, p. 23-46, 2001.
- Cascallares, G. *et al.* Role of the circadian clock in the statistics of locomotor activity in *Drosophila*. **PLoS One**, v. 13, e0202505, 2018.
- de Belle, J.S., Hilliker, A.J., Sokolowski, M.B. Genetic localization of foraging (for): a major gene for larval behavior in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.123, p.157-163. 1989.
- Dodd, C.S. Why do insects bite? A review of blood sucking behaviour. **Journal do Royal Army Medical Corps**, v. 141, p. 151-156, 1995.

- Dorn, P.L. *et al.* Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Zookeys**, v. 775, p. 69-95, 2018.
- Espínola, H.N. Nota sobre diferenças sexuais em formas imaturas de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 26, p. 263-267, 1966.
- Dubois, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- Ferreira, R.A., Guarneri, A.A., Lorenzo, M.G. Activity and shelter-related behaviour in *Rhodnius prolixus*: the role of host odours. **Acta Tropica**, v.196, p.150-154, 2019.
- Figueiras, A.N.L., Lazzari, C.R. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. **Physiological Entomology**, v. 23, p. 33-37, 1998.
- Figueiras, A.N.L. *et al.* Epicuticular lipids induce aggregation in Chagas disease vectors. **Parasites Vectors**, v.2, n. 8, 2009.
- Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v.62, p. 525-563, 2010.
- Franco, D.L., Frenkel, L., Ceriani, M.F. The underlying genetics of drosophila circadian behaviors. **Physiology**, v. 33, p. 50-62, 2018.
- Friend, W.G., Choy, C.T., Cartwright, E. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Ståhl (Hemiptera: Reduviidae). **Canadian journal of zoology**, v. 43, p. 891-904, 1965.
- Green, G. W. The control of spontaneous locomotor activity in *Phormia regina* Meigen—I. Locomotor activity patterns of intact flies. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 5, p. 711-726, 1964a.
- Green, G. W. The control of spontaneous locomotor activity in *Phormia regina* Meigen—II. Experiments to determine the mechanism involved. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 5, p. 727-752, 1964b.
- Grillo, L.A.M., Majerowicz, D., Gondim, K.C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 6, p. 579-588, 2007.
- Guarneri, A.A. *et al.* The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. **Physiology Entomolog**, v. 27, p. 142-147, 2002.
- Guarneri, A.A. *et al.* The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. **Physiology Entomology**, v. 28, p. 185-191, 2003.

Guerenstein, P.G., Guerin, P.M. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 585-97, 2001.

Guerenstein, P.G., Lazzari, C.R. Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. **Acta Tropica**, v.110, p.148-158, 2009.

Heilig, M. *et al.* Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. **Psychopharmacology**, v. 98, p. 524-529, 1989.

Helfrich-Förster, C. Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - sex-specific differences suggest a different quality of activity. **Journal of Biological Rhythms**, v.15, p. 135-154, 2000.

Hirayama, Y., Chino, H. A new method for determining lipase activity in locust fat body. **Insect biochemistry**, v.17, p. 85-88, 1987.

Hou, Q. L. *et al.* A role of corazonin receptor in larval-pupal transition and pupariation in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). **Frontiers in physiology**, v. 8, n. 77, 2017.

Hughes, A.R. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v.11, p. 609-623, 2008.

Ingram, K.K., Oefner, P., Gordon, D.M. Task-specific expression of the foraging gene in harvester ants. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 813-818, 2005.

Kaun, K.R., Chakaborty-Chatterjee, M., Sokolowski, M.B. Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. **Journal of Experimental Biology**, v, 211, n.19, p. 3160-3166, 2008.

Kaun, K.R., Sokolowski, M.B. cGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. **Genome**, v. 52, p. 1-7, 2009.

Kohsaka, H., A Guertin, P., Nose, A. Neural circuits underlying fly larval locomotion. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, p. 1722-1733, 2017.

Kollien, A.H., Schaub, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 59-63, 1998.

Kralj-Fišer, S., Schuett, W. Studying personality variation in invertebrates: why bother? **Animal Behaviour**, v. 91, p. 41-52, 2014.

Isabel, G. *et al.* AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n.2, p. R531-R538, 2005.

Juarez, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, v. 4, p. 147-166, 1970.

Lazzari, C.R., Pereira, M. H., Lorenzo, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, p.34-47, 2013.

Lazzari, C.R. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 81, p. 273-276, 1991.

Lazzari, C.R. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, p. 895-903, 1992.

Lazzari, C.R., Núñez, J.A. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, p. 525-529, 1989.

Lee, G., Park, J.H. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.167, n.1, p.311-323, 2004.

Lima-Cordon, L.A. *et al.* Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v. 820, p. 51–70, 2019.

Liu, Y. *et al.* Statistical analysis of zebrafish locomotor response. **PLoS One**, v.10, e0139521, 2015.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

Lorenz, M.W., Gäde, G. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. **Integrative and Comparative Biology**, v. 49, n. 4, p. 380-392, 2009.

Lorenzo, M.G., Lazzari, C.R. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v.70, p. 163-170, 1998.

Lorenzo, M.G., Lazzari, C.R. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. **Journal of Insect Physiology**, v.42, p.903-907, 1996.

Lucas, C. *et al.* The locust foraging gene. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.74, p.52-66, 2010.

Manrique, G., Lorenzo, M. The sexual behaviour of Chagas' disease vectors: chemical signals mediating communication between male and female Triatomine bugs. **Psyche A Journal of Entomology**, 2012.

Marlière, N.P. *et al.* Trypanosomes modify the behavior of their insect hosts: effects on locomotion and on the expression of a related gene. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e0003973, 2015.

Marlière, N.P. *et al.* **Atividade locomotora, uso de abrigos e predação em *Rhodnius prolixus*: alterações induzidas pela infecção por tripanosomatídeos.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 50 f, 2015.

Majerowicz, D. *et al.* The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: expression, characterization and function of RpACBP-1. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.72, p.41-52, 2016.

Martin, J.R., Ernst, R., Heisenberg, M. Temporal pattern of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Comparative Physiology A**, v.184, p.73-84, 1999.

Noireau, F., Dujardin, J.P. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.385-389, 2001.

Oliveira, T.R. *et al.* Equilibration time scales in closed many-body quantum systems. **New Journal of Physics**, v.20, n.3, 033032, 2018.

Osborne, K.A. *et al.* Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. **Science**, v.277, n.5327, p.834-836, 1997.

Paim, R.M. *et al.* Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. **BMC Research Notes**, v.5, n.128, 2012.

Pavan, M.G. *et al.* *Rhodnius prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae) nymphs show different locomotor patterns on an automated recording system. **Parasite Vector**, v.9, n.239, 2016.

Pereira, H.S., Sokolowski, M.B. Mutations in the larval foraging gene affect adult locomotory behavior after feeding in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p.5044-5046, 1993.

Pompanon, F., Fouillet, P., Bouletreau, M. Physiological and genetic factors as sources of variation in locomotion and activity rhythm in a parasitoid wasp (*Trichogramma brassicae*). **Physiology Entomology**, v.24, p.346-357, 1999.

Ponair Jr.G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, v.93, p.90-97, 2019.

Pontes, E.G. Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: the involvement of lipophorin binding sites. **Journal Insect Physiology**, v.54, p.790-797, 2008.

Pontes, G. *et al.* Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation. **Medical and Veterinary Entomology**, v.28, p.257-263, 2014.

Ragland, S.S., Sohal, R.S. Mating behavior, physical activity and aging in the housefly, *Musca domestica*. **Experimental Gerontology**, v.8, p.135-145, 1973.

Reisenman, C.E., Insausti, T.C., Lazzari, C.R. Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **The Journal of Experimental Biology**, v.205, p.201-210, 2002.

Reisenman, C.E., Lazzari, C. Spectral sensitivity of the photonegative reaction of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). **Journal of Comparative Physiology A**, v.192, p.39-44, 2006.

Reisenman, C.E., Lazzari, C.R., Giurfa, M., 1998. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Comparative Physiology A**, v.183, p.533-541, 1998.

Reynierse, J. H., Manning, A., Cafferty, D. The effects of hunger and thirst on body weight and activity in the cockroach (*Nauphoeta cinerea*). **Animal behaviour**, v.20, n. 4, p.751-757. 1972.

Ribeiro, J.M.C. *et al.* An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **PLOS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2594, 2014.

Robinson, G.E., Bem-Shahar, Y. Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? **Genes, Brain and Behavior**, v.1, p.197-203, 2002.

Sandman, C.A. Neuropeptides: Structure and function in biology and behavior. **New York Academy of Sciences**, v.897, 1999.

Sandoval, C.M. *et al.* Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.14, n.1, p.100-101, 2000.

Sarquis, O. *et al.* Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. **Journal Vector Ecology**, v.35, p.385-394, 2010.

Schaub, G.A. Auswirkungen von Parasiten auf das Verhalten ihrer Wirte. **Biologie in unserer Zeit**, v.19, n.6, p.196-202, 1989.

Schofield, C.J. *Triatominae*: biology & control. **Eurocommunica Publications**. 77pp, 1994.

Schofield, C.J., Galvão, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v.110, n. 2-3, p.88-100, 2009.

Schou, T.M. *et al.* Temperature and population density effects on locomotor activity of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Environmental Entomology**, v. 42, p.1322-1328, 2013.

Sih, A., Bell, A., Johnson, J.C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. **Trends in ecology & evolution**, v.19, p.372-378,2004.

Steele, J.E. Glycogen phosphorylase in insects. **Insect Biochemistry**, v.12, n. 2, p.131-147, 1982.

Takken, W., Knols, B.G. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.131-157, 1999.

Tobback, J. *et al.* Cloning and expression of PKG, a candidate foraging regulating gene in *Vespa vulgaris*. **Animal Biology**, v.58, n.341, 2008.

Tobback, J. *et al.* Age- and task-dependent foraging gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 76, p.30-42, 2011.

Thompson SN. Trehalose: the insect 'blood' sugar. Comprehensive review on trehalose in insects. **Advances in Insect Physiology**, v.31, p. 205-285, 2003.

Toth, A.L. *et al.* Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 24, p.4641-4649, 2005.

Ursic-Bedoya, R.J. *et al.* Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. **Journal Insect Physiology**, 54, p. 593-603, 2008.

Vitta, A.C.R. *et al.* The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v.101, p.147-152, 2007.

Vallejo G.A., Guhl F., Schaub G.A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 137-47, 2009.

Webster, B., Cardé, R.T. Use of habitat odour by host-seeking insects. **Biological Reviews**, v. 92, p.1241-1249, 2017.

Wigglesworth, V.B. The functions of corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Quarterly Journal Microscopic Science**. v, 79, p.91-121,1936.

Wigglesworth, V.B., Gillet, J.D. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. **Journal Experiment Biology**, v.11, p.120-138, 1934.

World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed 19 September 2019).

Wu, Q. *et al.* Developmental control of foraging and social behavior by the *Drosophila* neuropeptide Y-like system. **Neuron**, v.39, p.147-161, 2003.

Wu, Q. *et al.* Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.13289-13294, 2005a.

Wu, Q. *et al.* Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. **Nature Neuroscience**, v.8, n.1350, 2005b.

Zupanc, G.K.H., Lamprecht, J. Towards a cellular understanding of motivation: structural reorganization and biochemical switching as key mechanisms of behavioral plasticity. **Ethology**, v.106, p.467-477, 2000.

APÊNDICE

Journal of Insect Physiology 122 (2020) 10402



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Insect Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinsphys

Co-existing locomotory activity and gene expression profiles in a kissing-bug vector of Chagas disease

Newmar Pinto Marlière, Marcelo Gustavo Lorenzo, Luis Eduardo Martínez Villegas,



Alessandra Aparecida Guarneri

Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, Instituto René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG CEP 30190-009, Brazil



ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:

Rhodnius prolixus
Locomotory activity
Gene expression
Foraging gene
Chagas disease

The triatomine bug *Rhodnius prolixus* is a main vector of Chagas disease, which affects several million people in Latin-America. These nocturnal insects spend most of their locomotory activity during the first hours of the scotophase searching for suitable hosts. In this study we used multivariate analysis to characterize spontaneous locomotory activity profiles presented by 5th instar nymphs. In addition, we investigated whether sex and the expression of the foraging (*Rpfor*) gene could modulate this behavioral trait. Hierarchical Clustering and Redundancy Analyses detected individuals with distinct locomotory profiles. In addition to a great variation in locomotory intensity, we found that a proportion of nymphs walked during unusual time intervals. Locomotory activity profiles were mostly affected by the cumulative activity expressed by the nymphs. These effects promoted by cumulative activity were in turn influenced by nymph sex. Sex and the *Rpfor* expression had a significant influence on the profiles, as well as in the levels of total activity. In conclusion, the locomotory profiles evinced by the multivariate analyses suggest the co-existence of different foraging strategies in bugs. Additionally, we report sex-specific effects on the locomotion patterns of 5th instar *R. prolixus*, which are apparently modulated by the differential expression of the *Rpfor* gene.

1. Introduction

Locomotory activity is a complex behavioral trait which has been associated to diverse contexts such as foraging, the search for sexual partners or for appropriate hiding places (Franco et al., 2018; Guerenstein and Lazzari, 2009; Kaun and Sokolowski, 2009; Kohsaka et al., 2017; Takken and Knols, 1999). Insect locomotion can be modulated by diverse factors, as for example, genetic and phenotypic diversity and the way individuals interact in a community (Hughes et al., 2008), as well as age, sex, nutritional status, and circadian clocks (Cascallares et al., 2018; Pompanon et al., 1999). In addition, environmental conditions such as light, temperature and relative humidity will also impact insect locomotory activity profiles (Buchan and Sohal, 1981; Schou et al., 2013). Individual variation will be induced by these different endogenous or exogenous factors that affect the behavioral output through neural or neuroendocrine mechanisms (Zupanc and Lamprecht, 2000). In this scenario, the use of multivariate analyses to probe relations of parameters such as physiology, environment and development on locomotory patterns shown by animals becomes an interesting tool to address the intrinsic complexity hidden behind locomotory datasets (Ašmonaitė et al., 2016; Thorpe and Crompton, 2005; Yamamoto et al., 2018).

Triatomines are hematophagous insects, which in addition to taking blood from vertebrates, act as vectors of *Trypanosoma cruzi*. This parasite is the etiological agent of Chagas disease, a neglected health condition that currently affects 5–7 million people, particularly in Latin America (WHO, 2017). These nocturnal insects remain hidden in protected shelters during the day as a consequence of their intense thigmotaxis and negative phototaxis (Mota and Lorenzo, 2012; Reisenman et al., 1998; Ward and Finlayson, 1982). During dusk, with the decrease in light intensity, triatomines eventually start a period of spontaneous locomotion, leaving their shelters to search for hosts and then, a few hours before and during dawn they return to the safety of the refuge (Ferreira et al., 2019; Lorenzo and Lazzari, 1998). The intensity of the activity of triatomines depends on factors such as nutritional status (Bodin et al., 2008; Guarneri et

al., 2003; Lorenzo and Lazzari, 1998) and maturation (Bodin et al., 2009). The patterns of this spontaneous locomotory activity, as well as their regulation by endogenous clocks, were well characterized in *Triatoma infestans* (Lazzari, 1992). The daily patterns of locomotory activity of triatomines exhibit a bimodal profile, with an initial peak during the first hours of the scotophase and a second and narrower one that starts preceding the photophase (Guarneri et al., 2003; Lazzari, 1992; Lorenzo and Lazzari, 1998; Marlière et al., 2015; Pavan et al., 2016). Previous studies on triatomine locomotory activity have focused their analyses on average tendencies. We suggest here that the factors underlying the inherent variability of triatomine locomotion deserve attention, as they may reveal relevant biological features affecting bug performance under different predation risk scenarios.

Foraging (*for*) is an essential gene with pleiotropic effects on development and behavior (Hofmann, 2005). It encodes a cGMP-dependent protein kinase (PKG) that is found in diverse groups of organisms from *Paramecia* to humans and presents very conserved functions (Feil et al., 2005). In invertebrates, the foraging gene has been associated with the modulation of food-related behavior in different groups such as *Drosophila* (de Belle et al., 1989; Osborne et al., 1997; Pereira and Sokolowski, 1993), honey bees (Ben-Shahar, 2005), ants (Ingram et al.,

2005), nematodes (Fujiwara et al., 2002), social wasps (Tobback et al., 2008) and locusts (Lucas et al., 2010). We have previously shown that the levels of locomotory activity of *Rhodnius prolixus* are altered by trypanosome infection (Marlière et al., 2015). These changes coincided with an altered expression of *Rpfor*, the foraging gene orthologue of this species, suggesting that it participates in the modulation of triatomine activity.

In the present study, we characterized the distribution of locomotory events of starved 5th instar nymphs of *R. prolixus* along a 24 h interval. Then, we tested whether bug locomotory profiles would clusterize evincing differing activity profiles. We subsequently hypothesized that differing locomotory profiles correlate with *Rpfor*

expression. Furthermore, we decided to explore whether nymph sex would affect bug locomotory profiles as seen for adult *R. prolixus* (Pontes et al., 2014). Finally, we addressed whether these variables also affected the cumulative locomotion observed for each individual.

2. Methods

2.1. *Insects*

Rhodnius prolixus specimens used in our study came from a colony derived from insects collected in Honduras around 1990. Insects were maintained by the Vector Behavior and Pathogen Interaction Group at René Rachou Institute, Belo Horizonte, Brazil. Experimental bugs were fed citrated rabbit blood obtained from CECAL (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) offered through an artificial feeder at 37 °C, alternating with blood from anesthetized chicken. The latter were anesthetized with intraperitoneal injections of a mixture of ketamine (20 mg/kg; Cristália, Brazil) and detomidine (0.3 mg/kg; Syntec, Brazil), under license number LW-61/2012 (Committee for Ethics in the Use of Animals, CEUA-FIOCRUZ).

2.2. *Locomotory activity*

The locomotory activity of nymphs was evaluated by means of an automatic actometric system previously developed by our group (for details see Marlière et al., 2015). Briefly, the device consists of 40 individual recording units (5 × 10 × 2 cm boxes), each featuring three infrared (IR) light emitting diodes (LEDs) positioned face to face with their respective receivers to detect insect movement. This device was used to record bug locomotory activity in all assays reported in this study. During the experiments, room temperature was kept at 27 ± 1 °C and illumination provided at 12:12 LL/DD (light intensity = 60 LUX). Fifth instar nymphs starved for 30 days after ecdysis were used in all experiments to grant an adequate bug motivation for the expression of spontaneous host search activity (Ferreira et al., 2019). In each assay, nymphs were individually placed in the recording units that contained a piece of filter paper as a substrate lining the floor of each box (5 × 10 cm). Once an assay was set, the number of

movement events was continually recorded for each individual.

A preliminary experiment in which 32 nymphs were released and their movements recorded for 72 h, allowed comparing the number of movement events recorded for each of the three daily intervals. The corresponding dataset showed that the number of movements over the recorded interval showed less variability after the first day (data shown in Supporting Information Fig. S1). As a consequence we chose to restrict subsequent data sampling to the second day.

Two experiments were performed to analyze whether different locomotory profiles could co-exist in our bug colony. A first scrutiny characterized the hourly activity profile of 548 nymphs through a 24 h interval. In a second experiment, we selected a subsample of 65 nymphs reflecting the activity level diversity of the previous bug sample and sorted them by sex (Espínola, 1966). Afterwards, these insects were used to quantify the relative expression of the *Rpfor* gene by qPCR (RTqPCR). In total, 32 males and 33 females were used for this second experiment.

2.3. *RNA extraction and cDNA synthesis*

We initially evaluated the expression of the *Rpfor* gene in samples made of pooled brains or fat bodies obtained from insects with different physiological status. Gene expression patterns reflected physiological changes similarly for both tissues (Supplementary Fig. S2). Based on this, subsequent qPCR experiments focused on fat bodies, because samples from single individuals provided enough RNA for qPCR experiments. Fat body samples were dissected between 14 and 18 h after the end of locomotory activity assays. Total RNA was extracted using TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to manufacturer's instructions. The total RNA obtained was treated with Turbo DNA-free kit (Invitrogen, Vilnius, Lithuania) to eliminate genomic DNA. Sample concentration was determined using a Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Eugene, Oregon, USA). cDNA was synthesized from 500 ng of mRNA using the M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Promega, Fitchburg, WI, USA) and a modified oligo dT primer (MgdT 5'-

CGGGCAGTGAGCAACG (T12)-3') (Ursic-Bedoya et al., 2008) under the following conditions: 37 °C for 60 min and 95 °C for 5 min.

2.4. Quantification of Rpf for gene expression

Specific primers for Rpf for (Supplementary Table S1) were used in qPCR reactions to evaluate gene expression levels in individuals showing different locomotory profiles. All reactions contained 1 µl of cDNA, 0.5 µl of each primer (10 µM), and 5 µl of Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in a final volume of 10 µl. Experiments were conducted at the qReal-Time PCR Facility – RPT09D PDTIS/René Rachou Institute/FIOCRUZ MG in a ViiA 7 System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) under the following conditions: 10 min at 96 °C, followed by 40 cycles of 15sec at 95 °C and 20sec at 60 °C. Melting curve analyses confirmed the specificity of the reaction. All individual cDNA samples were evaluated in two technical replicates. qPCR results were analyzed by calculating the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Relative levels of expression for each insect were compared using α -tubulin (TUB) as a reference gene (Paim et al., 2012) (Supporting Information Table S1).

2.5. Statistical analysis

2.5.1. Hierarchical clustering and multivariate analyses

Two data matrices were built based on the activity profiles of individual nymphs. The first dataset encompassed the recordings obtained with 548 individuals throughout the 24 h interval. The second dataset included the number of movement events and molecular data obtained with the sex-sorted nymphs. Data analyses were performed using the R-software (v3.4) on the Rstudio suite version 1.1.423 (Team, 2015). A hierarchical clustering dendrogram and its corresponding heatmap were generated using the heatmap3 package (v1.1.1). As we considered the absence of movement (joint absences) to be biologically informative, we opted to follow the workflow suggested by Anderson et al. (2011). This implied estimating the pairwise dissimilarities between the objects in the matrix based on non-transformed raw counts

and Euclidean indices. For this purpose, the 'vegdist' function from the R-package 'vegan' (v2.5.2) was called within the heatmap3 function script.

To address the effect of potentially relevant biological variables accountable for the variance within the matrices, multivariate ordination tests of the RDA type (redundancy analysis based on an ordinary unweighted linear regression, and unweighted singular variable decompositions) were executed considering their respective explanatory matrices (dummy matrices). Briefly, for each of the evaluated datasets, the dummy matrices contained explanatory data such as sex [male/ female] (for 65 nymphs); total locomotion counts during the 24 h span; and normalized gene expression coefficients (for 65 nymphs). The analyses and corresponding biplots (scaling = 2, correlation plots focusing on response variables) were generated using the 'rda' function from the 'vegan' package (v2.4.6). Finally, to assess whether the hypothesized constraints could significantly explain the variance within the datasets, and thus how the response and explanatory variables interact, permutation-based MANOVA tests (PERMANOVA) were performed using the 'adonis2' function within the 'vegan' package (same version aforementioned) executing up to 9,999 permutations (Anderson, 2001; Anderson and Walsh, 2013). This multivariate analysis also generates an effect-size estimate (R^2) of the variance proportion explained by each of the hypothesized explanatory variables. A similar hypothesis testing approach was executed by Liu et al. (2015), when addressing how multiple biological effectors might contribute differently to the activity measured for zebrafish larvae.

2.5.2. Rpf for gene expression: Its correlation with sex and locomotor activity

Data depicting expression levels for the Rpf for gene in male and female nymphs were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. As expression levels did not adjust to a normal distribution, results were compared by means of the Mann Whitney test. A GLM-ANOVA was performed to test whether Rpf for expression and sex would influence the cumulative locomotory activity (24 h). Then, the Spearman's correlation coefficient was used to examine whether the cumulative activity was correlated to the relative

expression of Rpf for gene for each sex separately.

3. Results

The median number of locomotion events recorded for the 548 nymphs during the 24 h interval was of 246.5 (0–2,753). Fig. 1 presents the activity profile obtained showing the characteristic two peaks described by previous reports studying triatomine bugs (Guarneri et al., 2003; Lazzari, 1992; Lorenzo and Lazzari, 1998; Marlière et al., 2015; Pavan et al., 2016). These peak hours (8 and 20 h) concentrated approximately 18 and 16% of the movement events, respectively. In general, a higher activity was observed during the first four hours of the scotophase, which represented approximately half of all locomotory activity expressed. However, as indicated by the amplitude between min and max values, the number of movement events recorded varied expressively (Fig. 1).

To search for patterns based on individual locomotory activity profiles, we applied a multivariate analysis to generate a pairwise Euclidean distance matrix among hourly locomotion counts during the 24 h interval. A hierarchical clustering test was executed based on the recordings of individual activity (i.e., number of locomotion events per individual per hour). As seen in Fig. 2, three major blocks encompassing individuals with resembling dissimilarity patterns were identified based on dendrogram topology, heatmap intensity, and activity scatter plot (referred to as blocks 1, 2 and 3). Block number 1 (blue) contained 168 insects presenting an average of 461 movement events (113–1,468), while the 56 individuals from block 2 (green) showed an average of 918 events (410–2,753), and those in block 3 (pink, including 324 insects) an average of 147 events (0–796). Furthermore, by subdividing block 3 along its first node this cluster split in groups A (149) and B (175 individuals), showing an average of 251.2 (82–796) and 59.5 events (0–299), respectively. Of the total set of individuals, 30.7% belonged to block 1, 10.2% to block 2 and 59.1% to block 3 (subgroup A 27.2 and B 31.9%). The most active bugs were assigned to block 2, while the least active ones grouped in block 3B, which included those that remained inactive through the assay.

The RDA analysis using cumulative individual activity (i.e., the total number of locomotion events per individual over 24 h, henceforth referred to as total activity) as constraining variable, accounted for 42.59% of the total variance within the axes shown in Fig. 3 (RDA1; and PC1-summarizing unconstrained variance). From that, 29.27% of the variation was due to the proposed explanatory variable (total activity), and its influence upon the objects and their correlations is represented along axis RDA1. The length of the vector is a measure of the magnitude of the response variable (total activity). The dispersion observed between individuals points to the existence of different activity profiles. Insects with low or null activity were positioned at the base of the total activity vector. Thirty-seven nymphs (6.7%) that presented zero locomotion counts for the whole 24 h interval evaluated clustered at an $\approx 180^\circ$ angle regarding the total activity vector (scores converging approximately around the $[-0.4, 4.8e-2]$ coordinates). As the number of movement events increased, bugs were distributed in the two dimensions following a bimodal pattern in which individuals with similar total activity counts (but different temporal profiles) separated along the ordinate space (examples of individual per-hour activity profiles are shown in Supplementary Fig. S3). The further they followed the explanatory vector, the higher the magnitude of their response to this constraint, and their dissimilarity with the other individuals. The hourly intervals showing a stronger effect on total locomotion were 20, 21, 22, 23, and 24 (grouped below the activity vector). The hourly intervals corresponding to the photophase (from 9 to 19) grouped in the upper right quadrant of the ordinate space. The hourly intervals preceding the beginning of the photophase grouped close to the activity vector indicating that they share similar characteristics. In fact, this interval (except for 8 h) presented low and uniform locomotory activity for all nymphs.

Searching for factors potentially related to the locomotory profiles, a new RDA was performed based on the hourly activity of 65 *R. prolixus* nymphs over 24 h, and considering their total activity, sex and Rpf for gene expression as explanatory variables (Fig. 4).

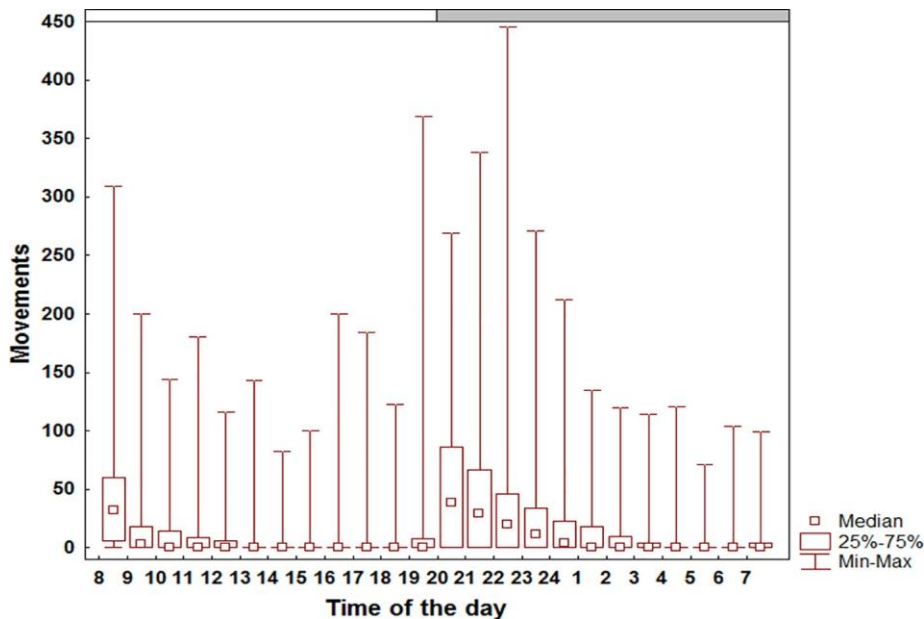


Fig. 1. Hourly median of movement events shown by 5th instar *Rhodnius prolixus* nymphs over a 24 h interval. The white and gray bars represent the photophase and scotophase, respectively. Data are presented as the median, 25%-75% quartiles, minimal and maximal values of the number of movement events per hour based on data collected with 548 insects.

According to the RDA, an estimated 45.32% of the variance among the profiles could be explained by the three variables. Total activity was the variable with the largest vector magnitude (Fig. 4). The position of the vector representing Rpfor expression ($\approx -270^\circ$) suggests a negative relation with the activity vector (Fig. 4). Males and females spread out differently along the activity vector, with the former dispersing preferentially through the space above the activity vector and the latter through the lower space. The position of the geometric means (centroids) in relation to the activity vector suggests different profiles of locomotory activity for males and females. We tested this hypothesis of sexually different locomotory profiles in a third dataset (including the hourly locomotion profiles of 175 individuals shown as Supplementary Fig. S4) and obtained a similar outcome. We therefore compared the levels of Rpfor expression in males and females and found that Rpfor gene expression was significantly higher for female nymphs (Supplementary Fig. S5, Mann Whitney, $p = 0.019$).

A PERMANOVA test was then performed to address the significance with which each of the proposed variables explained the response matrix variations (Table 1).

Globally, each of the variables tested, and the interaction between them drove 66.29% of the variance encompassed in the response matrix. Total locomotory activity was the most significant explanatory variable affecting locomotion profiles, presenting the largest effect size (Table 1; PERMANOVA, $p = 0.001$). Also significant, but with smaller effect sizes, were sex, Rpfor expression and the interaction between sex and total activity (Table 1; PERMANOVA, $p = 0.004$, $p = 0.005$ and $p = 0.01$, respectively). The significant interaction between sex and total activity indicated that the effects of total activity on the locomotion profiles were influenced by nymph sex.

As bug cumulative activity was the main factor influencing the different locomotion profiles, we tested whether the levels of activity were affected by gene expression and sex. We found a significant effect of sex and Rpfor expression on total bug activity (Table 2; GLM-ANOVA, $p < 0.0001$ for both parameters). The significant interaction between sex and Rpfor expression (Table 2; GLM-ANOVA, $p < 0.0001$)

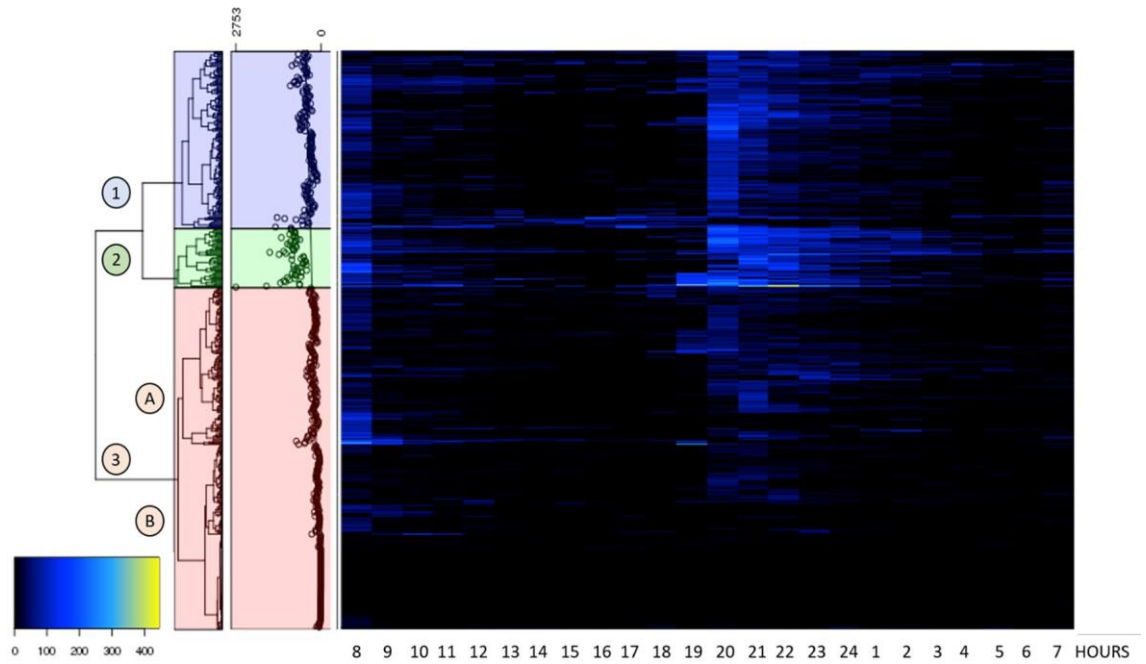


Fig. 2. Hierarchical clustering of triatomine locomotory profiles based upon number of movements per hour and their pairwise Euclidean distances. The heatmap depicts the degree of dissimilarity amongst the 548 individuals during 24 h. The middle panel, between the heatmap and the dendrogram, presents a scatter plot of the total activity recorded for each individual throughout the selected interval. The colored areas and trend line in the scatter plot aid visualizing the dendrogram topology as they discriminate deeper node tips from each other according to the proposed blocks based on total locomotion counts and dissimilarity patterns. Block number 1 (blue) contains 168 insects, block 2 (green) is composed by 56 individuals, and block 3 (pink) by 324 insects. Block 3 was subdivided along its first node in groups A and B, with 149 and 175 individuals, respectively).

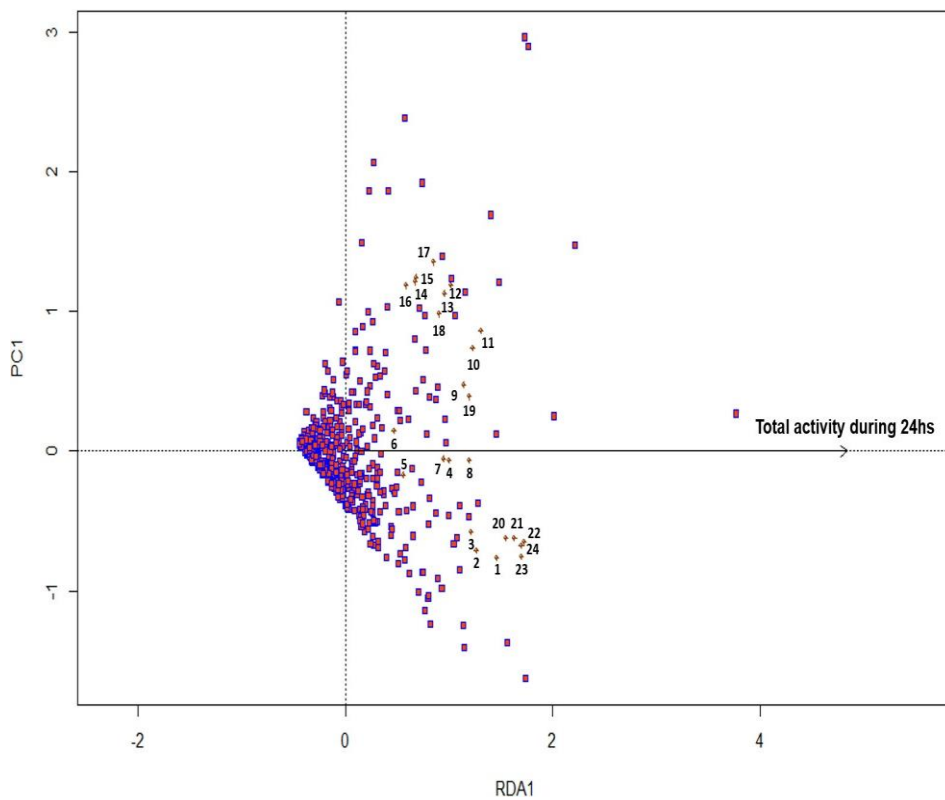


Fig. 3. Redundancy analysis (RDA) biplot considering total activity throughout a 24 h interval as explanatory variable. The RDA depicts how individuals dispersed on the (constrained) ordination space based upon Euclidean dissimilarities between their locomotion profiles. The patterns of variation within the dataset of response variable measures were constrained by the total activity counts recorded during a 24 h interval (vector pointing right along the horizontal axis). In total, 42.59% of the variance is depicted in the biplot. From it, the proposed explanatory variable (total activity) accounts for 29.27% of the total variance within the response matrix and is depicted as axis RDA1. Axis PC1 encompassed 13.32% of the unconstrained variance. Each square represents one individual in the ordinate space. The numbers represent the hours of the day.

indicated that the effects of *Rpfor* expression on the levels of total activity were highly affected by nymph sex. We further tested whether total activity and gene expression were correlated in each of the sexes. A positive, but non-significant, correlation between total activity and *Rpfor* expression was found for female nymphs (Spearman correlation, $r_s = +0.32$; $p = 0.067$). Interestingly, a significant negative correlation between total male activity and *Rpfor* expression was detected (Spearman correlation, $r_s = -0.67$; $p > 0.0001$).

4. Discussion

As reported in the literature (Guarneri et al., 2003; Lazzari, 1992; Lorenzo and Lazzari, 1998; Marlière et al., 2015), the insects tested in this study showed two peaks of activity in both, the beginning of the scotophase and photophase. As expected, half of all locomotion events were concentrated in the first hours of the scotophase. Nevertheless, the pairwise comparison of hourly movement events uncovered clearly distinct activity profiles. The hierarchical clustering divided our locomotion dataset into three principal branches as a result of the activity levels recorded and the hour in which movement was detected. Interestingly, more active insects showed the highest dissimilarities, while insects that tended to stay motionless showed higher homogeneity. Our results suggest that different locomotory strategies co-exist in *R. prolixus*. We acknowledge the intrinsic limitations of laboratory colonies in terms of genetic variability. Therefore, it would be relevant to test whether the locomotion profiles of sylvatic *R. prolixus* resemble those reported here.

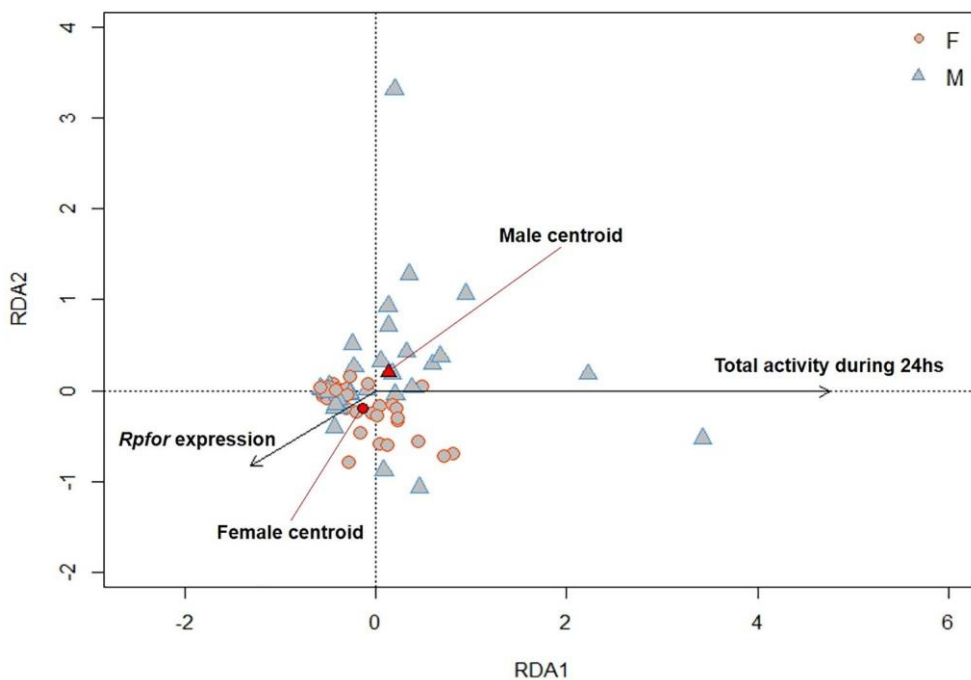


Fig. 4. Redundancy analysis (RDA) biplot considering biological effectors. The RDA plot depicts how male and female individuals distributed along the biplot. Locomotion profile dissimilarities were constrained by explanatory variables accounting for total activity during 24 h, sex, and *Rpfor* gene expression profiles. In total, 45.32% of the variance within the matrix is driven by the proposed variables. From it, 98.09% of the constrained variance resolved along the horizontal axis (RDA1), whereas 1.52% is resolved along RDA2. Male and female locomotion profiles were found to differ significantly based on the permutational MANOVA.

RDA1: Encompasses 98.09% out of the 45.32% variance constrained by the proposed variables.
RDA2: Encompasses 1.52% out of the 45.32% variance constrained by the proposed variables.

Table 1
Permutational non-parametric multivariate analysis of variance.

Factor	DF	R ₂	F	Pr(> F)	
Total_activity	1	0.5455	93.842	0.001	**
Sex	1	0.0294	5.059	0.004	**
Rpfor	1	0.0424	7.305	0.005	**
Sex:Rpfor	1	0.0083	1.439	0.200	
Sex:Total_activity	1	0.0287	4.948	0.011	*
Rpfor:Total_activity	1	0.0083	1.427	0.215	
Residual	58	0.3371			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.

Evaluated formula =matrix65v24 ~(((Sex * FOR)) + (Sex * Total_activity) + (FOR * Total_activity)), data = dummy65iexp, permutations =999, method = "euclid", by = "terms").

Table 2
GLM analysis of the effects of Rpfor expression and sex on the cumulative activity of Rhodnius prolixus nymphs.

	Estimate	Std. Error	Z Value	Pr(> z)	
(Intercept)	5.4849	0.0217	252.60	< 2e-16	***
Sex	1.8700	0.0279	66.95	< 2e-16	***
Rpfor	1.4693	0.0676	21.73	< 2e-16	***
Sex:Rpfor	-7.3204	0.1237	-59.16	< 2e-16	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 0. Evaluated formula =glm (formula = Total_activity ~Sex * FOR, family = poisson())

As expected, the multivariate analyses (HC and RDA) suggested that the temporal dimension was the main factor influencing activity levels. Interestingly, two unknown features of kissing-bug locomotory patterns were revealed by applying these analyses. Firstly, we determined that our robust bug sample consists of individuals showing differentiated levels of activity, as shown in the three main branches created by the dendrogram. At the extremes, approximately 7% of the nymphs did not move, while 3% of them produced more than a thousand movement events during the same interval. The very different activity profiles reported in the dendrogram may represent coexisting energy investment strategies and their ecological relevance deserves to be studied. Nutritional shortage scenarios are common in the sylvatic ecotopes of triatomines (Noireau and Dujardin, 2001; Sarquis et al., 2010). Under such circumstances, low activity could be advantageous to avoid consuming nutritional reserves while waiting for a blood-source to arrive to the ecotope. As an alternative strategy, intense locomotion could allow other individuals to approach a distant host, overcoming their nutritional shortage at increased predation risks induced by exposure outside shelters.

The second uncovered feature was the presence of individuals with similar activity levels that grouped separately according to dissimilarities in their temporal profiles. More specifically, their main activity bouts were expressed at different times. In order to explore the dataset in more detail we decided to focus on the expression of activity during the photophase. To avoid considering activity belonging to the tails of the main peaks, we excluded the two hours after lights on and before lights off from this calculation. This revealed that 21.9% of the insects were active in half of the hours belonging to this interval. Furthermore, 1.8% of them moved in all hours of the photophase. This temporal locomotory spread may also be an advantageous strategy in a nutritional shortage scenario, as foraging outside conventional hours would allow feeding on nocturnal vertebrates when these enter their resting state. In fact, opossums are fundamentally nocturnal and their blood is consistently detected in the gut of sylvatic insects (Hernández et al., 2016; Sasaki et al., 2003). It is important to acknowledge that this was not the predominant locomotion profile, suggesting that being active during daytime increases predation risk. It is also worth pointing out that this experiment was performed with individuals that lacked access to shelters and co-specific aggregations. According to our current knowledge about shelter use by kissing-bugs, most individuals tend to group inside a refuge each night and only a small fraction of them leaves the protected places spontaneously (Ferreira et al., 2019; Lorenzo and Lazzari,

1998). In this sense, future studies are necessary to address whether insects that leave shelters in the absence of host cues belong to any of the different activity profiles seen here. To confirm the existence of individuals which are active during the day, one should also evaluate the dynamics of the use of shelters during the light phase, in both the presence and absence of host cues.

Our results are also suggestive of sex-specific behavioral profiles expressed by *R. prolixus* 5th instar nymphs. Sexually dimorphic locomotion patterns have been reported previously for house flies and *Drosophila melanogaster* (Bahrdorff et al., 2012; Belgacem and Martin, 2002; Buchan and Sohal, 1981; Helfrich-Förster, 2000; Martin et al., 1999; Ragland and Sohal, 1973). This is also the case for triatomines, for which adult bug behavior differs according to sex, as male kissingbugs show active locomotory responses to sexual signals, while females do not (Manrique and Lorenzo, 2012). Indeed, the motivation to leave shelters is strikingly different for male and female kissing-bugs (Pontes et al., 2014). These authors showed that a relevant proportion of adult female bugs leaves shelters spontaneously and forages in the absence of host cues. Notably, the presence of males in the same environment does not alter this profile (Pontes et al., 2014). On the other hand, female odors promote the activation and orientation of adult males that otherwise do not seem to leave shelters. Ours is the first study reporting sex-specific locomotory activity profiles in immature triatomines. As mentioned, bugs were not exposed to shelter-associated stimuli or conspecifics, which would induce akinesia and aggregation behavior. Further studies should clarify whether sex-specific differences in locomotory activity expressed by nymphs relate to the search for sexual signals by immature male insects.

The expression of *Rpfor* influenced spontaneous locomotory activity significantly, reinforcing its suggested role in the modulation of foraging profiles. In addition, we found that the *Rpfor* gene affects total bug activity in a sex-dependent way. In fact, the inverse correlation between the total activity vector of males and *Rpfor* expression, suggests that decreased *Rpfor* expression induces increased male locomotory activity. Positive (Ben-Shahar et al., 2002; Lucas et al., 2010; Pereira and Sokolowski, 1993; Tobback et al., 2011) and inverse (Ingram et al., 2005; George et al., 2020; Tobback et al., 2008) correlations between foraging expression and locomotory activity have been reported.

In conclusion, cluster analysis evinced distinguishable locomotion patterns that may represent diverse energy investment strategies. Then, multivariate analyses have provided original perspectives on the molecular control of the expression of kissing-bug locomotory activity. Furthermore, they allowed us to identify unexpected sex-specific patterns of 5th instar nymph locomotion, which are apparently affected by the differential expression of the *Rpfor* gene.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, grant numbers CRA-APQ-00569-15 and CRA-PPM-00162-17), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 441999/2014-0), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCTEM/CNPq, grant number 465678/2014-9), Programa Estratégico de Apoio a Pesquisa em Saúde (PAPES VI/FIOCRUZ, grant number 407614/2012-5). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

CRedit authorship contribution statement

Newmar Pinto Marlière: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. Marcelo Gustavo Lorenzo: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition. Luis Eduardo Martínez Villegas: Methodology, Formal analysis, Writing - review & editing, Visualization. Alessandra Aparecida Guarneri: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

AAG and MGL were supported by CNPq productivity grants. MGL received funding from Le Studium (Short Term Contract of Employment N° 2017-2001-179 - Y17F16). The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104021>.

References

- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070>. pp. x.
- Anderson, M.J., Crist, T.O., Chase, J.M., Vellend, M., Inouye, B.D., Freestone, A.L., Sanders, N.J., Cornell, H.V., Comita, L.S., Davies, K.F., Harrison, S.P., Kraft, N.J.B., Stegen, J.C., Swenson, N.G., 2011. Navigating the multiple meanings of β diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecol. Lett.* 14, 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01552>.
- Anderson, M.J., Walsh, D.C., 2013. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing? *Ecol. Monogr.* 83, 557–574. <https://doi.org/10.1890/12-2010.1>.
- Ašmonaitė, G., Boyer, S., de Souza, K.B., Wassmur, B., Sturve, J., 2016. Behavioural toxicity assessment of silver ions and nanoparticles on zebrafish using a locomotion profiling approach. *Aquat. Toxicol.* 173, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.01.013>.
- Bahrndorff, S., Kjærsgaard, A., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Schou, T.M., Skovgård, H., Hald, B., 2012. The effects of sex-ratio and density on locomotor activity in the house fly, *Musca domestica*. *J. Insect Sci.* 12, 71. <https://doi.org/10.1673/031.012.7101>.
- Belgacem, Y.H., Martin, J.R., 2002. Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15154–15158. <https://doi.org/10.1073/pnas.232244199>.
- Ben-Shahar, Y., 2005. The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J. Comp. Physiol. A.* 191, 987–994. <https://doi.org/10.1007/s00359-0050025-1>.
- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M.B., Robinson, G.E., 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296, 741–744. <https://doi.org/10.1126/science.1069911>.
- Bodin, A., Barrozo, R.B., Couton, L., Lazzari, C.R., 2008. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 54, 1343–1348. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.004>.
- Bodin, A., Vinauger, C., Lazzari, C.R., 2009. State-dependency of host-seeking in *Rhodnius prolixus*: The post-ecdysis time. *J. Insect Physiol.* 55, 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.02.004>.
- Buchan, P.B., Sohal, R.S., 1981. Effect of temperature and different sex ratios on physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 16, 223–228. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(81\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0531-5565(81)90017-6).
- Cascallares, G., Riva, S., Franco, D.L., Risau-Gusman, S., Gleiser, P.M., 2018. Role of the circadian clock in the statistics of locomotor activity in *Drosophila*. *PloS One* 13 (8), e0202505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202505>.
- de Belle, J.S., Hilliker, A.J., Sokolowski, M.B., 1989. Genetic localization of foraging (for): a major gene for larval behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 123, 157–163.
- Espínola, H.N., 1966. Nota sobre diferenças sexuais em formas imaturas de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Biol.* 26, 263–267.
- Feil, R., Hofmann, F., Kleppisch, T., 2005. Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev. Neurosci.* 16, 23–41. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2005>.

- Ferreira, R.A., Guarneri, A.A., Lorenzo, M.G., 2019. Activity and shelter-related behaviour in *Rhodnius prolixus*: the role of host odours. *Acta Trop.* 196, 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.022>.
- Franco, D.L., Frenkel, L., Ceriani, M.F., 2018. The underlying genetics of drosophila circadian behaviors. *Physiology* 33, 50–62. <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2017>.
- Fujiwara, M., Sengupta, P.I., Mcintire, S.L., 2002. Regulation of body size and behavioral state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase. *Neuron* 36 (6), 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01093-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01093-0).
- George, E.A., Bröger, A.K., Thamm, M., Brockmann, A., Scheiner, R., 2020. Inter-individual variation in honey bee dance intensity correlates with expression of the foraging gene. *Genes Brain Behav.* 19, e12592. <https://doi.org/10.1111/gbb.12592>.
- Guarneri, A.A., Lazzari, C., Xavier, A.A.P., Diotaiuti, L., Lorenzo, M.G., 2003. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiol. Entomol.* 28, 185–191. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2003.00330.x>.
- Guerenstein, P.G., Lazzari, C.R., 2009. Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Trop.* 110, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.019>.
- Helfrich-Förster, C., 2000. Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster*—sex-specific differences suggest a different quality of activity. *J. Biol. Rhythm.* 15, 135–154. <https://doi.org/10.1177/074873040001500208>.
- Hernández, C., Salazar, C., Brochero, H., Teherán, A., Buitrago, L.S., Vera, M., Soto, H., Florez-Rivadeneira, Z., Ardila, S., Parra-Henao, G., Ramírez, J.D., 2016. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasit. Vectors* 9 (1), 620. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1907-5>.
- Hofmann, F., 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 1–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400035200>.
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T., Underwood, N., Vellend, M., 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol. Lett.* 11, 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>.
- Ingram, K.K., Oefner, P., Gordon, D.M., 2005. Task-specific expression of the foraging gene in harvester ants. *Mol. Ecol.* 14, 813–818. <https://doi.org/10.1111/j.1365294X.2005.02450.x>.
- Kaun, K.R., Sokolowski, M.B., 2009. cGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. *Genome* 52, 1–7. <https://doi.org/10.1139/G08-090>.
- Kohsaka, H.A., Guertin, P., Nose, A., 2017. Neural circuits underlying fly larval locomotion. *Curr. Pharm. Des.* 23, 1722–1733. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161208120835>.
- Lazzari, C.R., 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* 38, 895–903. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(92\)90101-I](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90101-I).
- Liu, Y., Carmer, R., Zhang, G., Venkatraman, P., Brown, S.A., Pang, C.P., Zhang, M., Ma, P., Leung, Y.F., 2015. Statistical analysis of zebrafish locomotor response. *PLoS One* 10 (10), e0139521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139521>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lorenzo, M.G., Lazzari, C.R., 1998. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* 70, 163–170. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00025-4).
- Lucas, C., Kornfein, R., Chakaborty-Chatterjee, M., Schonfeld, J., Geva, N., Sokolowski, M.B., Ayali, A., 2010. The locust foraging gene. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 74, 52–66. <https://doi.org/10.1002/arch.20363>.

- Manrique, G., Lorenzo, M., 2012. The sexual behaviour of Chagas' disease vectors: chemical signals mediating communication between male and female Triatomine bugs. *Psyche J. Entomol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/862891>.
- Marlière, N.P., Latorre-Estivalis, J.M., Lorenzo, M.G., Carrasco, D., Alves-Silva, J., Rodrigues, J.O., Ferreira, L.L., Lara, L.M., Lowenberger, C., Guarneri, A.A., 2015. Trypanosomes modify the behavior of their insect hosts: effects on locomotion and on the expression of a related gene. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (8), e0003973. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003973>.
- Martin, J.R., Ernst, R., Heisenberg, M., 1999. Temporal pattern of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A.* 184, 73–84.
- Mota, T., Lorenzo, M.G., 2012. Lack of segregation between two species of Chagas disease vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 109–116. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0168>.
- Noireau, F., Dujardin, J.P., 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96, 385–389. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000300018>.
- Osborne, K.A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R.A., Coulthard, A., Pereira, H.S., Greenspan, R.J., Sokolowski, M.B., 1997. Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science* 277, 834–836. <https://doi.org/10.1126/science.277.5327.834>.
- Paim, R.M., Pereira, M.H., Di Ponzio, R., Rodrigues, J.O., Guarneri, A.A., Gontijo, N.F., Araújo, R.N., 2012. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *BMC Res. Notes.* 5, 128. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-128>.
- Pavan, M.G., Corrêa-Antônio, J., Peixoto, A.A., Monteiro, F.A., Rivas, G.B., 2016. *Rhodnius prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae) nymphs show different locomotor patterns on an automated recording system. *Parasite. Vector.* 9 (1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1482-9>.
- Pereira, H.S., Sokolowski, M.B., 1993. Mutations in the larval foraging gene affect adult locomotory behavior after feeding in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5044–5046. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5044>.
- Pompanon, F., Fouillet, P., Bouletreau, M., 1999. Physiological and genetic factors as sources of variation in locomotion and activity rhythm in a parasitoid wasp (*Trichogramma brassicae*). *Physiol. Entomol.* 24, 346–357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00150.x>.
- Pontes, G., Zacharias, C.A., Manrique, G., Lorenzo, M.G., 2014. Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation. *Med. Vet. Entomol.* 28, 257–263. <https://doi.org/10.1111/mve.12040>.
- Ragland, S.S., Sohal, R.S., 1973. Mating behavior, physical activity and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 8, 135–145. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(73\)90003-X](https://doi.org/10.1016/0531-5565(73)90003-X).
- Reisenman, C.E., Lazzari, C.R., Giurfa, M., 1998. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol. A.* 183, 533–541.
- Sasaki, H., Rosales, R., Tabaru, Y., 2003. Host feeding profiles of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in Guatemala (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Med. Entomol. Zool.* 15, 283–289.
- Sarquis, O., Carvalho-Costa, F.A., Oliveira, L.S., Duarte, R., D'Andrea, P.S., De Oliveira, T.G., Lima, M.M., 2010. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J. Vector Ecol.* 35, 385–394. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00097.x>.
- Schou, T.M., Faurby, S., Kjærsgaard, A., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Hald, B., Bahrndorff, S., 2013. Temperature and population density effects on locomotor activity of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Environ. Entomol.* 42, 1322–1328. <https://doi.org/10.1603/EN13039>.

- Takken, W., Knols, B.G., 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* 44, 131–157. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.131>.
- Team, R., 2015. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio Inc, Boston, MA.
- Tobback, J., Heylen, K., Gobin, B., Wenseleers, T., Billen, J., Arckens, L., Huybrechts, R., 2008. Cloning and expression of PKG, a candidate foraging regulating gene in *Vespa vulgaris*. *Anim. Biol.* 58, 341. <https://doi.org/10.1163/157075608X383665>.
- Tobback, J., Mommaerts, V., Vandersmissen, H.P., Smagghe, G., Huybrechts, R., 2011. Age- and task-dependent foraging gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 76, 30–42. <https://doi.org/10.1002/arch.20401>.
- Thorpe, S.K., Crompton, R.H., 2005. Locomotor ecology of wild orangutans (*Pongo pygmaeus abelii*) in the Gunung Leuser Ecosystem, Sumatra, Indonesia: A multivariate analysis using log-linear modelling. *Am. J. Phys. Anthropol.* 127, 58–78. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20151>.
- Ursic-Bedoya, R.J., Nazzari, H., Cooper, D., Triana, O., Wolff, M., Lowenberger, C., 2008. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *J. Insect Physiol.* 54, 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.12.009>.
- Ward, J.P., Finlayson, L.H., 1982. Behavioural responses of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) to visual stimuli. *Bull. Entomol. Res.* 72, 357–366. <https://doi.org/10.1017/S0007485300013535>.
- World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed 19 September 2019).
- Yamamoto, K., Gris, K.V., Sotelo Fonseca, J.E., Gharagozloo, M., Mahmoud, S., Simard, C., Houle-Martel, D., Cloutier, T., Gris, P., Gris, D., 2018. Exhaustive multi-parametric assessment of the behavioral array of daily activities of mice using cluster and factor analysis. *Front. Behav. Neurosci.* 30 (12), 187. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00187>.
- Zupanc, G.K.H., Lamprecht, J., 2000. Towards a cellular understanding of motivation: structural reorganization and biochemical switching as key mechanisms of behavioral plasticity. *Ethology* 106, 467–477. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00546.x>.