

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

**Efeito dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em aspectos do *fitness* de
*Rhodnius prolixus***

por

Maria Raquel Fellet Belinato

Belo Horizonte

Agosto/2014

TESE

DDIP-CPqRR

M.R.F. BELINATO

2014

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

**Efeito dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em aspectos do *fitness* de
*Rhodnius prolixus***

por

Maria Raquel Fellet Belinato

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

Orientação: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

Co-orientação: Dra. Alessandra Aparecida Guarneri

Dr. Simon Luke Elliot

Belo Horizonte

Agosto/2014

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

B431e Belinato, Maria Raquel Fellet.
2014

Efeito dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em aspectos do *fitness* de *Rhodnius prolixus* / Maria Raquel Fellet Belinato. – Belo Horizonte, 2014.

120 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 94 - 120

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

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Trypanosoma cruzi* /parasitologia 3. *Trypanosoma rangeli*/parasitologia I. Título. II. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Orientação). III. Guarneri, Alessandra Aparecida (Co-orientação) IV. Elliot, Simon Luke (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 3

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

**Efeito dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em aspectos do *fitness* de
*Rhodnius prolixus***

por

Maria Raquel Fellet Belinato

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (Presidente)

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho

Prof. Dra. Marli Maria Lima

Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira

Suplente: Rodrigo Pedro Pinto Soares

Tese defendida e aprovada em: 22/08/2014

“Na jornada: percalços, pedras, desafios, passos trôpegos. Para novos caminhos, pés descalços, outras estradas, tantas bifurcações. Sempre levarei comigo, o peso das minhas escolhas, as lágrimas das minhas frustrações, o agradecimento as minhas conquistas, o encerramento de mais um ciclo, a esperança do amanhã, a leveza da minha alma e toda minha verdade. Se foi cedo ou tarde demais, já não sei, sei que é o meu momento de alçar novos voos, pois ainda tenho muito a percorrer.”

Esther de Oliveira Amaral (poeta e amiga do coração)

DEDICATÓRIAS

Dedico essa tese à minha família: Cristina, César, Luiz Fernando e Thiago.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Alessandra Guarneri e Marcelo Lorenzo pela dedicação, ensinamentos, sugestões, enfim, pelo enriquecimento, indispensáveis para minha formação.

Ao Sam Elliot pelas sugetões, por me incentivar a crescer e mudar para Entomologia Médica e também por sugerir a Alessandra como orientadora.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo conhecimento transmitido, importante para o aprimoramento desse trabalho.

À Lú Ferreira pela revisão da tese e pelas valiosas sugestões.

Ao João de Deus por atender aos meus chamados de elétrica e eletrônica durante os experimentos e restaurá-los sempre de maneira eficiente e com o melhor sorriso no rosto.

Aos colaboradores do laboratório de Parasitologia da UFMG pela disponibilização do espaço, equipamentos e ajudas indisponíveis para execução de um dos experimentos da tese, em especial à Rafa, Layana, Gabriel, Nelder e Ricardo.

Às amigas que se iniciaram no René Rachou e que levarei pra toda a vida: Jú, Lú, Roberts, Thessa, Ana Lu, Lelê, Fê, Carol e Antônio pelos auxílios intelectuais, mas principalmente, pelo colo quando preciso, pelas risadas gostosas que fazem a vida mais leve, pelas saidinhas revigorantes, enfim por serem tão queridos!

Ao New por ser “o homem do laboratório” e aguentar nossos chamados para reparar ou ensinar algo essencial para execução dos experimentos de comportamento. Mas também pela amizade, carinho e acolhida do meu marido em BH!

Aos demais colegas e ex-colegas do LATEC que sempre foram excelentes companhias nesses 4 anos e que sempre me ajudaram nem que fossem com um sorriso e energia positiva, em especial: João Paulo, José Manuel, Liléia, Sílvia, Dr. João, Ademilson, Carlota, Grasi, Gina, Natália, Marinely, Jorge, Aline, Elisa, Raquelita, Fernando, Guilherme Magno, Valéria, José Eloi, Chris, Gabí, Alisson, Emerson, Letícia, Rita, Raíssa, Gabriel, Anatiele, Mercedes, Ivana, Guilherme, Marina, Mariana, Michelle, João Victor, Regiana, Isabela Neme, Mari Neme, Mari Reis, Inês, Daniela Portela, Daniela Lage, Renata, Kenia, Adriana e Dona Antônia.

Ao Rafael Braga pelo incentivo à carreira científica e entomológica e pelo carinho de sempre.

À Luana (Fiocruz-RJ) e Neide (Fiocruz-PE) pela amizade, carinho, incentivo e por terem feito parte de um momento que despertou a coisa mais bonita da minha vida!

À minha mãe e amiga pelos incentivos desde criança, por me lembrar nos momentos de fraqueza, que são eles que nos fazem crescer, pelo apoio e fé, pelo exemplo de profissional competente e realizada e pelo amor incondicional!

Ao meu marido Thiago, pelo modelo de profissional competente, centrado e dedicado, pelas inúmeras contribuições na tese, mas principalmente, pelo companherismo, pela dedicação, paciência, incentivo e amor incessante! Você foi peça chave para esse passo!

Ao meu pai e irmão pelo carinho, pelos momentos de descontração, pelo amor e por respeitarem que, muitas vezes, eu precisava ficar quieta na minha “toca” para escrever!

Às amigas de coração e de toda a trajetória da vida, em especial: Bruna, Marcela, Esther, Laurinha, Jú e Mirella que compreenderam minha ausência, mas sabiam que ela significava busca e crescimento, mas nunca abandono!

Às pequeninas Jujú Amaral, Gabí de Abreu e Marianna Belinato que encheram minha vida de alegria, me fizeram a tia mais feliz do mundo e me mostraram um amor puro de criança que eu não conhecia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, ao Centro de Pesquisas René Rachou pela oportunidade e aos demais funcionários da instituição.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pelas excelentes sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos bibliotecários pelo fornecimento de artigos raros e pela normatização da tese.

Enfim, obrigada a todos que me acompanharam nessa caminhada.

Às agências de fomento:

- Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz/CPqRR);
- Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia-Entomologia Molecular (INCT-EM);

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
RESUMO.....	xx
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Doença de Chagas.....	22
1.2 Triatomíneos	23
1.3 Comportamento dos triatomíneos	25
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.4.1 Interação <i>Trypanosoma cruzi</i> -hospedeiro invertebrado	29
1.5 <i>Trypanosoma rangeli</i>	32
1.5.1 Interação <i>Trypanosoma rangeli</i> -hospedeiro invertebrado	34
1.6 <i>Rhodnius prolixus</i>	35
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MÉTODOS.....	40
3.1 Triatomíneos	40
3.2 Preparação dos parasitos	40
3.3 Preparação do sangue para as infecções	41
3.4 Infecção por <i>T. cruzi</i>	41
3.5 Infecção por <i>T. rangeli</i>	42
3.6 A infecção por tripanosomas sobre a fecundidade e fertilidade de <i>R. prolixus</i>	44
3.6.1 Desenho experimental	44

3.6.2 Avaliação dos ensaios	45
3.7 A infecção por tripanosomas na qualidade de ovos e ninfas de primeiro estágio de <i>R. prolixus</i>	45
3.7.1 Peso e medidas	46
3.7.2 Determinação da quantidade de proteínas totais	46
3.7.3 Tempo até a eclosão e sobrevivência ao jejum de ninfas recém eclodidas	46
3.8 A infecção por tripanosomas e o comportamento de cópula de <i>R. prolixus</i>	47
3.9 A infecção por tripanosomas na escolha do parceiro para a cópula	48
3.10 A infecção por tripanosomas sobre a frequência do início do voo em <i>R. prolixus</i>	50
3.11 Análises estatísticas	52
4 RESULTADOS	54
4.1 A infecção por tripanosomas sobre a fecundidade e fertilidade de <i>R. prolixus</i>	54
4.1.1 Período de pré-oviposição	54
4.1.2 Valor E e fertilidade de insetos infectados por <i>T. cruzi</i> 25-25°C	54
4.1.3 Valor E e fertilidade de insetos infectados por <i>T. cruzi</i> 30-25°C	55
4.1.4 Valor E e fertilidade de insetos infectados por <i>T. rangeli</i> 25-25°C	55
4.1.5 O efeito da temperatura sobre a evolução da infecção por <i>T. cruzi</i>	57
4.1.6 Efeito das infecções por diferentes parasitos	57
4.2 A infecção por tripanosomas na qualidade de ovos e ninfas de primeiro estágio de <i>R. prolixus</i>	59
4.2.1 <i>T. cruzi</i> 30-25°C	59
4.2.2 <i>T. rangeli</i> 25-25°C	60
4.3 A infecção por tripanosomas e o comportamento de cópula de <i>R. prolixus</i>	62
4.3.1 <i>T. cruzi</i> 25-25°C	62
4.3.2 <i>T. cruzi</i> 30-25°C	63
4.3.3 <i>T. rangeli</i> 25-25°C	64
4.4 A infecção por tripanosomas na escolha do parceiro para a cópula	66
4.4.1 <i>T. cruzi</i> 30-25°C	66

4.4.2 <i>T. rangeli</i> 25-25°C.....	67
4.5 A infecção por tripanosomas sobre a frequência do início do voo em <i>R. prolixus</i>	68
4.5.1 <i>T. cruzi</i> 30-25°C	68
4.5.2 <i>T. rangeli</i> 25-25°C.....	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES.....	83
7 ANEXO.....	85
7.1 Artigo publicado	85
8 REFERÊNCIAS	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo biológico de *Rhodnius prolixus*** – ovos, ninfas de 1º a 5º estádios (NI-NV) e adultos (macho e fêmea) (Foto: Newmar Marlière).....24
- Figura 2 – Ciclo biológico de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado** A) formas tripomastigotas sanguíneas no intestino médio anterior; B) formas epimastigotas no intestino médio posterior e C) formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas na ampola retal – Garcia et al 2007.....29
- Figura 3 – Ciclo biológico de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado** A) formas tripomastigotas sanguíneas e epimastigotas no intestino médio anterior e epimastigotas na hemocele; B) formas epimastigotas na ampola retal C) formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas na glândula salivar – Adaptado de Garcia et al 2007 e <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=89>.....33
- Figura 4 – Distribuição geográfica de *R. prolixus* na América do Sul e Central** - Adaptado de Cuba Cuba 1998; Pontes 2010.....37
- Figura 5 – Alimentador artificial acoplado a banho-maria** (à esquerda) e **alimentação de insetos no alimentador** (à direita, Fotos: M^a Raquel Fellet).....41
- Figura 6 – Inóculo de ninfas de 4º estágio de *R. prolixus*** (Foto: Luciana Ferreira).....41
- Figura 7 – Arena de vidro para o ensaio de cópula** (à esquerda) e **par em cópula** (à direita, Fotos: M^a Raquel Fellet).....47
- Figura 8 – Arena de vidro contendo o inseto a escolher acima e os insetos a serem escolhidos antes da liberação – dentro dos potes de plástico** (à esquerda) e **par em cópula** (à direita, Fotos: M^a Raquel Fellet).....49
- Figura 9 – Gaiola para os ensaios de início de voo** - câmera de vídeo (acima da caixa), arena de vidro com haste (no centro da caixa), tubo com ventilador no interior (à direita da caixa) e videocassete do tipo timelapse (à direita da foto, Foto: M^a Raquel Fellet).....50
- Figura 10 – Período de pré-oviposição de pares de *R. prolixus* infectados por:** A) *T. cruzi* 25-25°C; B) *T. cruzi* 30-25°C e C) *T. rangeli* 25-25°C. As medianas, quartis, mínimos e máximos números de dias antes da primeira oviposição estão mostrados em cada *box plot*. A

cor verde representa dados obtidos de insetos controle e a vermelha dados de insetos infectados. Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas no período de pré-oviposição das fêmeas, Teste *Wilcoxon*, $p < 0,05$54

Figura 11 – Valor E de pares de *R. prolixus* infectados por: A) *T. cruzi* 25-25°C; B) *T. cruzi* 30-25°C e C) *T. rangeli* 25-25°C. Os dados representam as médias±e.p. do parâmetro registradas para 15 pares controle e 19 infectados por *T. cruzi* 25-25°C (A), 20 pares controle e 20 infectados por *T. cruzi* 30-25°C (B) e 20 pares controle e 20 infectados por *T. rangeli* 25-25°C (C). A cor verde representa dados obtidos de insetos controle e a vermelha dados de insetos infectados. Os ciclos correspondem períodos de 21 dias entre alimentações e representam o valor E para cada par em um determinado ciclo. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos controle e infectado, Modelo linear de efeitos mistos, $*p < 0,05$56

Figura 12 – Taxa de eclosão de ovos de pares de *R. prolixus* infectados por: A) *T. cruzi* 25-25°C; B) *T. cruzi* 30-25°C e C) *T. rangeli* 25-25°C. Os dados representam a porcentagem (média±e.p.) de eclosão dos ovos de 15 pares controle e 19 infectados por *T. cruzi* 25-25°C (A), 17 pares controle e 20 infectados por *T. cruzi* 30-25°C (B) e 20 pares controle e 19 infectados por *T. rangeli* 25-25°C (C). A cor verde representa os dados obtidos com insetos controle e a vermelha os obtidos com insetos infectados. Os ciclos correspondem períodos de 21 dias entre alimentações e representam as taxas de eclosão para cada par em um determinado ciclo. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos controle e infectado, Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, $*p < 0,05$56

Figura 13 – Comparação dos efeitos das infecções por tripanosomas no valor E (A-B) e na taxa de eclosão dos ovos (C-D) de *R. prolixus*. A) Variação do valor E entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. cruzi* 30-25°C e seus correspondentes controles; B) variação do valor E entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. rangeli* 25-25°C e seus correspondentes controles; C) variação da taxa de eclosão dos ovos entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. cruzi* 30-25°C e seus correspondentes controles; D) variação da taxa de eclosão dos ovos entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. rangeli* 25-25°C e seus correspondentes controles. Os dados representam as médias±e.p. de 15 pares controle e 19 infectados por *T. cruzi* 25-25°C (A-D), 20 pares controle e 20 infectados por *T. cruzi* 30-25°C (A e C) e 20 pares controle e 20 infectados por *T. rangeli* 25-25°C (B e D). A cor verde representa os dados obtidos com insetos infectados e

controle de *T. cruzi* 25-25°C (A-D), a vermelha representa os resultados obtidos com os insetos infectados e controle de *T. cruzi* 30-25°C (A E C) e a azul representa os resultados obtidos com os insetos infectados e controle de *T. rangeli* 25-25°C (B e D). Os pontos representam os valores E e as taxas de eclosão de cada par em cada um dos ciclos.....58

Figura 14 – Comparação da qualidade de ovos de pares de *R. prolixus* infectados por *T. cruzi* 30-25°C - A) Peso B) Comprimento C) Largura D) Quantidade de proteínas totais. Cor verde representam ovos provenientes de pares controle e vermelha representam ovos provenientes de pares infectados. Cada ponto representa um ovo. Os traços horizontais representam médias, exceto em B que representam medianas. Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os tratamentos, Teste T em A, C e D e Teste *Mann Whitney* em B, $p < 0,05$59

Figura 15 – Comparação da qualidade de ninfas de 1º estágio de *R. prolixus* provenientes de pares infectados por *T. cruzi* 30-25°C - A) Tempo até a eclosão. B) Resistência ao jejum. Cor verde representam as ninfas provenientes de pares controle e vermelha representam ninfas provenientes de pares infectados. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos, Teste *Mann Whitney* em A e Log-rank – Teste *Mantel-Cox* em B, $p > 0,05$60

Figura 16 – Comparação da qualidade de ovos de pares de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* 25-25°C - A) Peso B) Comprimento C) Largura D) Quantidade de proteínas totais. Cor verde representam ovos provenientes de pares controle e vermelha representam ovos provenientes de pares infectados. Cada ponto representa um ovo. Os traços horizontais representam: A e B médias e em C e D medianas. Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os tratamentos, Teste T em A e B e Teste *Mann Whitney* em C e D, $p < 0,05$61

Figura 17 – Comparação da qualidade de ninfas de 1º estágio de *R. prolixus* provenientes de pares infectados por *T. rangeli* 25-25°C - A) Tempo até a eclosão. B) Resistência ao jejum. Cor verde representam as ninfas provenientes de pares controle e vermelha representam ninfas provenientes de pares infectados. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos, Teste *Mann Whitney* em A e Log-rank – Teste *Mantel-Cox* em B, $p > 0,05$61

Figura 18 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 25-25°C sobre a frequência de cópula (%) de pares de *R. prolixus* - Barras cinzas escuras indicam os pares que copularam e barras cinzas claras indicam pares que não copularam. Pares: mcfc, macho controle e fêmea controle; mifi, macho infectado e fêmea infectada; mifc, macho infectado e fêmea controle e mcfi, macho controle e fêmea infectada. Os números nas barras indicam o número de pares em cada tratamento. Para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc), Chi-quadrado, $p > 0,05$62

Figura 19 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a frequência de cópula (%) de pares de *R. prolixus* - Barras cinzas escuras indicam os pares que copularam e barras cinzas claras indicam pares que não copularam. Pares: mcfc, macho controle e fêmea controle; mifi, macho infectado e fêmea infectada; mifc, macho infectado e fêmea controle e mcfi, macho controle e fêmea infectada. Os números nas barras indicam o número de pares. Para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc), Chi-quadrado, $p > 0,05$63

Figura 20 – Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a frequência de cópula (%) de pares de *R. prolixus* - Barras cinzas escuras indicam os pares que copularam e barras cinzas claras indicam pares que não copularam. Pares: mcfc, macho controle e fêmea controle; mifi, macho infectado e fêmea infectada; mifc, macho infectado e fêmea controle e mcfi, macho controle e fêmea infectada. Os números nas barras indicam o número de pares. Os asteriscos representam diferenças significativas entre o tratamento e o grupo controle (mcfc), Chi-quadrado, $*p < 0,05$65

Figura 21 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a frequência de escolha (%) de parceiro sexual: A) machos – um macho não infectado escolhe entre: uma fêmea controle e uma fêmea infectada por *T. cruzi*. B) fêmeas – uma fêmea não infectada escolhe entre: um macho controle e um macho infectado por *T. cruzi*. Os números nas barras indicam o número de grupos testados. Barras verdes indicam a frequência de escolha de insetos controle e as barras vermelhas a de insetos infectados (Para ambas as análises, Teste binomial, $*p < 0,05$67

Figura 22 – Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a frequência de escolha (%) de parceiro sexual: A) machos – um macho não infectado escolhe entre: uma fêmea controle e uma fêmea infectada por *T. rangeli*. B) fêmeas – uma fêmea não infectada escolhe entre: um macho controle e um macho infectado por *T. rangeli*. Os números nas barras indicam o número de grupos testados. Barras verdes indicam a frequência de escolha de insetos controle

e as barras vermelhas a de insetos infectados (Para ambas as análises, Teste binomial, $*p < 0,05$67

Figura 23 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a frequência de voo (%) de *R. prolixus*: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam a porcentagem de insetos que saíram da arena circular mediante o voo e as vermelhas representam a dos insetos que não saíram da arena. Os números nas barras indicam o número total de insetos em cada tratamento. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Chi-quadrado, $*p < 0,05$68

Figura 24 – Razão de fracasso/sucesso de *R. prolixus* infectados por *T. cruzi* 30-25°C: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam os dados de insetos controle e as vermelhas representam os de insetos infectados.....69

Figura 25 – Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a frequência de voo (%) de *R. prolixus*: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam a porcentagem de insetos que saíram da arena circular mediante o voo e as vermelhas representam a dos insetos que não saíram da arena. Os números nas barras indicam o número total de insetos em cada tratamento. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Chi-quadrado, $*p < 0,05$70

Figura 26 – Razão de fracasso/sucesso de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* 25-25°C: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam os dados de insetos controle e as vermelhas representam os de insetos infectados.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da infecção por <i>T. cruzi</i> 25-25°C sobre a latência para o início da cópula e a sua duração em pares de <i>R. prolixus</i>	63
Tabela 2 – Efeito da infecção por <i>T. cruzi</i> 30-25°C sobre a latência para o início da cópula e a sua duração em pares de <i>R. prolixus</i>	64
Tabela 3 – Efeito da infecção por <i>T. rangeli</i> 25-25°C sobre a latência para o início da cópula e a sua duração em pares de <i>R. prolixus</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm/s – centímetros por segundo

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CHOACHI – linhagem de cepa de *T. rangeli*

CL – linhagem de cepa de *T. cruzi*

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

E – escuro

fc – fêmea controle

fi – fêmea infectada

L – luz

LATEC – Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

LED – Light-emitting diode

LIT – Liver Infusion Tryptose

mc – macho controle

mi – macho infectado

NI – ninfa de primeiro estágio

NII – ninfa de segundo estágio

NIII – ninfa de terceiro estágio

NIV – ninfa de quarto estágio

NV – ninfa de quinto estágio

NaH₂PO₄ – fosfato de sódio

p – nível de significância

PBS – Phosphate Buffered Saline

PVC – Policloreto de vinila

U.R. – umidade relativa

VHS – Video Home System

WHO – World Health Organization

RESUMO

Os triatomíneos são insetos hematófagos capazes de transmitir *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Existem poucos estudos sobre a virulência do parasito ao inseto vetor e, com isso, o parasito tem sido considerado por diversos autores como não-patogênico nesse sentido. *Trypanosoma rangeli*, outro protozoário transmitido por triatomíneos, não é patogênico ao homem, mas apesar de vários efeitos negativos ao vetor serem conhecidos, seu papel sobre o comportamento e a biologia reprodutiva do inseto ainda não foi investigado. Essa tese avaliou o efeito da infecção por *T. cruzi* (em duas temperaturas de criação: 25-25°C - os insetos foram mantidos em 25°C durante as fases ninfal e adulta e 30-25°C - os insetos foram mantidos a 30°C durante a fase ninfal e transferidos para 25°C após a muda imaginal) e por *T. rangeli* - somente em 25-25°C, em aspectos reprodutivos e no comportamento de cópula e voo de *R. prolixus*. Inicialmente, foi demonstrado que tanto *T. cruzi* 30-25°C quanto *T. rangeli* causaram uma diminuição na fecundidade e fertilidade dos triatomíneos, sendo os efeitos decorrentes da infecção por *T. rangeli* mais evidentes. Além disso, foi observado para os mesmos grupos que a presença dos parasitos diminuiu o tamanho, o peso e o conteúdo proteico de ovos postos por pares infectados. O comportamento sexual dos insetos também foi afetado pelas infecções por *T. rangeli* e *T. cruzi* (30-25°C). A frequência e duração da cópula em ensaios sem escolha de parceiro somente foram alteradas na infecção por *T. rangeli*. Interessantemente, quando foi permitido a insetos não infectados escolherem entre um parceiro infectado e um não infectado, um número significativamente maior escolheu parceiros não infectados, em infecções por *T. cruzi* e *T. rangeli*. O comportamento de início de voo também foi alterado em decorrência das infecções. Ambos os parasitos diminuíram a frequência de início de voo dos insetos. Adicionalmente, um maior número de fracassos nas tentativas de início de voo foi visto nos insetos infectados em comparação aos sem infecção. De maneira geral, as infecções por *T. cruzi* e *T. rangeli* produziram efeitos negativos no *fitness* de *R. prolixus*. No caso de *T. cruzi* a temperatura de criação dos insetos parece ser relevante para a ocorrência dos efeitos. Será importante investigar ainda se os insetos são capazes de controlar comportamentalmente as populações de parasitos, escolhendo, por exemplo, temperaturas ambientais adequadas ou se os tripanosomas podem manipular ativamente o comportamento dos triatomíneos para seu próprio benefício.

ABSTRACT

Triatomine bugs are bloodsucking insects capable of transmitting *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. There are few studies on the virulence of this parasite to its vector and thereby, *T. cruzi* has been considered by several authors as non-pathogenic in this sense. *Trypanosoma rangeli*, another protozoan transmitted by triatomine bugs, is not pathogenic to humans, but despite several negative effects to the vector being known, their role on the behavior and reproductive biology of this insect has not been investigated yet. This thesis evaluated the effect of *T. cruzi* (at two rearing temperatures: 25-25°C – the insects were kept at 25°C both during ninfal and adult phases and 30-25°C - the insects were kept at 30°C and transferred to 25°C after the imaginal molt) and *T. rangeli* (25-25°C) infections on reproductive, mating and flight behavior of *R. prolixus*. First we have shown that both *T. cruzi* 30-25°C and *T. rangeli* caused a decrease in fecundity and fertility of triatomines and these effects were more evident on *T. rangeli* infection. Furthermore, it was observed for the same groups that the presence of parasites decreased size, weight and protein content of eggs laid by infected pairs. The sexual behavior of insects was also affected by both *T. rangeli* and *T. cruzi* (30-25°C) infection. The frequency and duration of matings in assays without mating choice were only altered by *T. rangeli* infection. Interestingly, when uninfected insects were allowed to choose between uninfected and infected partners, significantly more individuals chose uninfected partners in both *T. cruzi* and *T. rangeli* infections. The behavior of flight initiation was also altered as a result of infections. Both parasites decreased the frequency of flight initiation of insects. Additionally, an increased number of failures on flight initiation was observed in infected insects when compared to uninfected ones. Generally, infection by *T. cruzi* and *T. rangeli* resulted in negative effects on fitness of *R. prolixus*. In the case of *T. cruzi*, the rearing temperature of insects seems to be important for the occurrence of effects. It will be important to further investigate whether triatomines present behavioral responses that may control trypanosome growth through actively choosing, for example, appropriate environmental temperatures or whether trypanosomes actively manipulate the insect behavior to their own benefit.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma enfermidade grave cujo agente etiológico é o protozoário flagelado denominado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Esse parasito é transmitido aos seres humanos por insetos da subfamília Triatominae, principalmente algumas espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. *Trypanosoma cruzi* também é encontrado em mamíferos silvestres e domésticos, podendo ser transmitido aos mesmos pelas fezes e urina de triatomíneos infectados, adquirido pela predação de insetos infectados ou ainda pela predação de mamíferos infectados (Lent & Wygodzinsky 1979). Acredita-se que há aproximadamente 200-300 anos o ciclo da doença era restrito aos animais silvestres. Entretanto, a ação antrópica afetou diversos ecossistemas e permitiu a criação de ciclos peridomésticos e domésticos quando, acidentalmente, o *T. cruzi* se tornou causador da doença em humanos (Coura 2007; Coura & Dias 2009; Coura & Borges-Pereira 2010).

Atualmente, entre sete e oito milhões de indivíduos estão infectados pelo *T. cruzi* (Schofield et al 2006; WHO 2014) e, aproximadamente 80 milhões de pessoas estão em áreas com risco de infecção (Coura & Dias 2009). A doença de Chagas é uma das mais importantes infecções parasitárias humanas na América Central e do Sul, tanto em termos de impacto social, quanto econômico (Schofield 1994; Noireau et al 2005). A doença em humanos tem uma variada apresentação clínica e estima-se que 30% dos indivíduos infectados pelo parasito desenvolvem sintomas da doença. Após a infecção, há uma curta fase aguda, com duração aproximada de dois meses, que é caracterizada por uma alta carga parasitária. Na maioria dos casos, os sintomas são ausentes ou suaves; quando presentes incluem febre, dor de cabeça, aumento do volume dos gânglios linfáticos, palidez e dores musculares (Prata 2001; Macedo et al 2004; WHO 2014). Os casos fatais na fase aguda somam apenas 0,1% em relação ao total de diagnósticos. Essas mortes geralmente são relacionadas à insuficiência cardíaca e/ou às meningites e encefalites (Teixeira et al 2006; WHO 2014). Após a fase aguda, a infecção evolui para uma fase crônica, caracterizada por uma baixa carga parasitária e um quadro clínico diversificado. Nessa fase, a sintomatologia pode não ocorrer ou mesmo se apresentar de maneira severa (Prata 2001). Os sintomas incluem distúrbios cardíacos, neurológicos e alargamento do esôfago ou cólon, que geralmente ocorrem décadas após o início da infecção (Higushi et al 1999; Coura 2007; Coura & Borges-Pereira 2010; WHO 2014). De modo geral, as complicações ocasionadas pela infecção podem conduzir os

pacientes chagásicos a morte súbita ou insuficiência cardíaca devido à destruição progressiva do músculo cardíaco (Prata 1999; WHO 2014).

A transmissão do parasito pela via vetorial, ou seja, através das fezes de triatomíneos infectados que entram em contato com uma injúria na pele, tem sido controlada em diversos países através da melhoria das habitações humanas e do uso de inseticidas residuais (Dias et al 2002; Gürtler et al 2007; Vázquez-Prokopec et al 2009). Apesar dessas estratégias, muitas pessoas ainda convivem com vetores infectados em diversas regiões da América Latina (Coura & Dias 2009). Existem também outras vias de infecção por *T. cruzi*, como a de transfusão sanguínea (Young et al 2007), de transplante de órgãos de indivíduos infectados, de transmissão vertical (Gürtler et al 2003; Carlier et al 2011), de acidentes de laboratório (Dias 1987) e de ingestão de comida ou bebida contaminadas (Barbosa 2006).

Até o presente momento não existem vacinas contra o protozoário causador da doença de Chagas e o tratamento somente é eficaz quando realizado no início da infecção. Por isso, a principal forma de combate à doença ainda ocorre por meio do controle das populações domésticas de triatomíneos através do uso de inseticidas (Schofield 1994; Schofield et al 2006; WHO 2014).

1.2 Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Mais de 6000 espécies de Reduviidae já foram descritas até o presente, sendo que 145 delas pertencem à subfamília Triatominae, distribuídas em 15 gêneros e cinco tribos (Lent & Wygodzinsky 1979; Schofield & Galvão 2009; Rosa et al 2012; Abad-Franch et al 2013; Gonçalves et al 2013; Jurberg et al 2013; Poinar 2013). Essa subfamília tem a hematofagia como característica marcante, já que todas as espécies desse grupo necessitam da ingestão de sangue (Lent & Wygodzinsky 1979). Os triatomíneos são insetos hemimetábolos que passam por cinco estádios ninfais até atingirem a fase adulta (Figura 1).

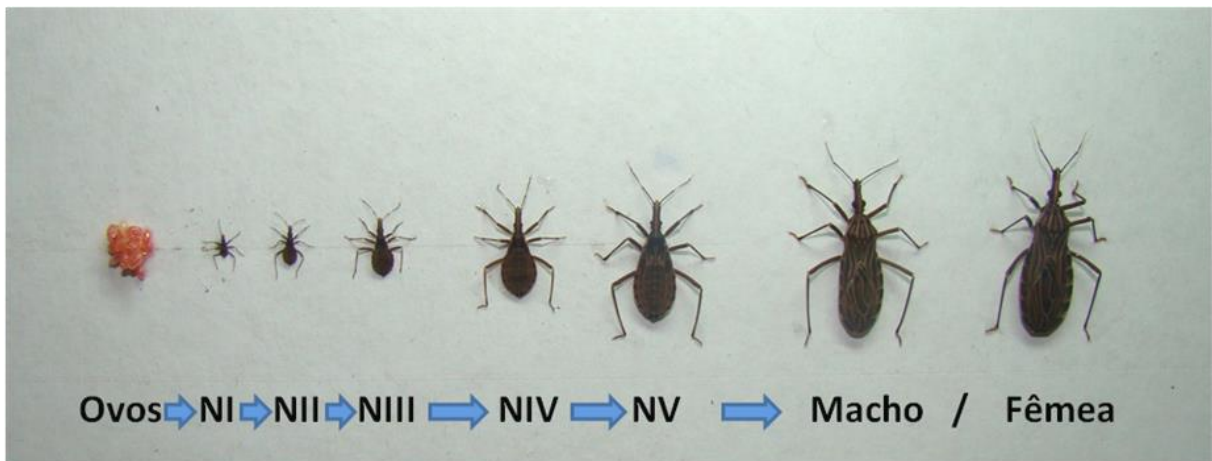


Figura 1 – Ciclo biológico de *Rhodnius prolixus* – ovos, ninfas de 1º a 5º estádios (NI-NV) e adultos (macho e fêmea) (Foto: Newmar Marlière).

Durante todas as fases de desenvolvimento destes insetos são necessários repastos sanguíneos para permitir a sua muda para o próximo estágio. Os adultos, de ambos os sexos também precisam se alimentar de sangue para sua sobrevivência e produção de ovos férteis (Buxton 1930). O aparelho bucal dos triatomíneos é adaptado para penetrar na pele do hospedeiro, encontrar os vasos sanguíneos e sugar o sangue sem ser percebido. Além disso, esses insetos realizam repastos sanguíneos fartos e/ou ocasionais e podem suportar longos períodos sem alimentação (Friend & Smith 1985).

Apesar de ser considerado que todas as espécies de Triatominae possuem competência de transmitir *T. cruzi*, algumas possuem maior relevância epidemiológica. A maioria das espécies de triatomíneos está restrita a ambientes silvestres onde colonizam ninhos de aves, que não são susceptíveis ao *T. cruzi*, e tocas de mamíferos (Lent & Wygodzinsky 1979). Algumas espécies como *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, no entanto, também se adaptaram aos ambientes domésticos e peridomésticos (como galinheiros, chiqueiros e currais). Essas espécies de triatomíneos passaram a se alimentar de sangue de animais e de humanos que habitam esses ambientes (Schofield 1994; Noireau et al 2002; Noireau et al 2005). Os mesmos podem ser encontrados com densidades populacionais importantes em moradias de diversas regiões rurais da América Latina, onde eventualmente podem transmitir o parasito para humanos (Noireau et al 2005). As espécies de triatomíneos descritas acima são definidas como vetores principais, devido à sua grande capacidade de colonização de habitações humanas, altos índices de infecção natural pelo *T. cruzi* e

relevância epidemiológica pela transmissão efetiva do parasito aos humanos (Schofield 1994; Noireau et al 2005).

1.3 Comportamento dos triatomíneos

Os triatomíneos são insetos noturnos, tanto as ninfas quanto os adultos passam a fase clara do dia abrigados em fendas e outras cavidades (Wigglesworth 1950). Assim como todos os insetos, para se orientar os triatomíneos podem utilizar pistas químicas, térmicas e visuais (Gullan & Cranston 2007). As substâncias químicas podem ser usadas para a comunicação intraespecífica (feromônios sexuais, de agregação e de alarme) e interespecífica (aleloquímicos). Os aleloquímicos também podem ser utilizados para reconhecimento de fatores ambientais, como a detecção de alimentos e de locais adequados para oviposição (Gullan & Cranston 2008). Os estímulos químicos recebidos podem orientar os triatomíneos frente a correntes de ar que os guiem ou promovam seu afastamento de uma determinada fonte de odor, como por exemplo, hospedeiros, predadores (Taneja & Guerin 1995) ou coespecíficos (Vitta 2009; Pontes 2010). Os adultos coespecíficos podem emitir compostos voláteis oriundos das glândulas exócrinas: metasternais, localizadas na região ventral do tórax e de Brindley, localizadas no abdômen (Crespo & Manrique 2007; Pontes et al 2008; Zacharias et al 2010; Pontes & Lorenzo 2012). Baldwin et al (1971) ao estudar *R. prolixus* e Manrique & Lazzari (1995), estudando *T. infestans*, mostraram que durante a cópula são emitidos compostos que causam agregação de machos ao redor do casal. Posteriormente, foi demonstrado que os compostos eram emitidos pelas glândulas metasternais das fêmeas (Manrique et al 2006; Pontes & Lorenzo 2012) e que eram emitidos principalmente nas primeiras horas da fase escura do dia, que corresponde ao horário de maior atividade dos triatomíneos (Pontes et al 2008). Segundo Crespo & Manrique (2007), odores emitidos pelas glândulas de Brindley não mostraram envolvimento com a cópula. Alguns autores sugerem que devido aos componentes da secreção dessa glândula e as evidências comportamentais, as mesmas devem estar associadas à defesa e alarme (Schofield 1979; Ward 1981; Manrique et al 2006). Substâncias químicas, além de serem utilizadas pelos triatomíneos para a sua comunicação sexual, podem também auxiliar os mesmos na detecção de hospedeiros, quando são emitidas por esses (Nuñez 1982; Taneja & Guerin 1995; Taneja & Guerin 1997; Barrozo & Lazzari 2003; Barrozo & Lazzari 2004a,b,c; Barrozo & Lazzari 2006). Outro tipo de pista utilizada pelos triatomíneos para detecção de hospedeiro é a térmica, ou seja, a radiação infravermelha emitida pelos hospedeiros (Flores & Lazzari 1996; Lazzari 2009;

Fresquet & Lazzari 2011). Os triatomíneos são capazes de procurar e localizar o hospedeiro e se orientarem para aqueles que caracterizam hospedeiros endotérmicos (Lazzari & Núñez 1989; Flores & Lazzari 1996). São ainda, capazes de distinguir com precisão diferenças de temperaturas na superfície da pele, causadas pela presença de veias de maior ou menor calibre (Ferreira et al 2007).

Os triatomíneos sincronizam suas atividades de acordo com o ciclo ambiental de luz-escurecimento. Os ciclos circadianos de atividade são controlados por mecanismos endógenos de relógio celular que permitem aos organismos ajustarem diversos processos e atividades de acordo com as mudanças cíclicas diárias de fatores ambientais tais como a iluminação e a temperatura (Lazzari 1992; Reisenman et al 1998). Os triatomíneos possuem picos bimodais diários de atividade locomotora: ao anoitecer, atribuído principalmente à busca do hospedeiro e dispersão pelo voo e ao amanhecer, atribuído à busca de abrigo (Lazzari 1992; Lorenzo & Lazzari 1998). Esse sincronismo tem grande valor adaptativo, já que, aumenta a chance do inseto encontrar seus hospedeiros adormecidos e, ainda, o protege de predadores (Reisenman & Lazzari 2006). Os ciclos circadianos espontâneos já foram descritos para diversos outros comportamentos do inseto: oviposição e eclosão, ecdise, agregação e dispersão, incluindo locomoção e voo (Lehane & Schofield 1982; Nuñez 1982; Ampleford 1985; Ampleford & Davey 1989; Lazzari 1992).

Os triatomíneos podem se dispersar de diversas maneiras. Em muitos casos, podem ser transportados de maneira passiva, juntamente com pertences humanos ou ainda através da deposição de ovos em penas ou pelos de animais (Schilman et al 1996; Galvão et al 2001). Apesar de serem insetos fundamentalmente caminhadores, os triatomíneos utilizam o voo para a sua dispersão na fase adulta (Noireau et al 2001; Carbajal de la Fuente et al 2007). Esse é um dos meios utilizados pelos adultos para se dispersar e colonizar novas áreas (Schweigmann et al 1988). Os triatomíneos possuem fototaxia negativa, ou seja, evitam ambientes iluminados (Reisenman & Lazzari 1998). Alguns autores, no entanto, relatam que os triatomíneos, assim como muitos outros insetos noturnos, são atraídos pela luz artificial durante o voo (Schweigmann et al 1988; Wisnivesky-Colli et al 1993; Noireau & Dujardin 2001; Vazquez-Prokopec et al 2004; Minoli & Lazzari 2006; Carbajal de la Fuente et al 2007). A atração pela luz é importante para a epidemiologia da doença de Chagas, já que os insetos atraídos pela iluminação artificial podem voar e invadir as habitações humanas e, conseqüentemente, se reproduzir e colonizar esses ambientes (Wisnivesky-Colli et al 1993; Minoli & Lazzari 2006). O voo desses insetos também está relacionado às suas densidades populacionais (McEwen et al 1993), mas é modulado principalmente pelo estado nutricional

(Lehane et al 1992) e reprodutivo dos triatomíneos (McEwen & Lehane 1994). Recentemente, foi demonstrado que os odores das glândulas metasternais de fêmeas promovem o início de voo de machos de *R. prolixus* (Zacharias et al 2010).

Após a sua maturação sexual, os triatomíneos buscam um parceiro para a cópula. Durante a cópula, o macho insemina a fêmea através da transferência de um espermatóforo que contém espermatozoides e substâncias produzidas pelas suas glândulas acessórias. Uma vez dentro da fêmea, os espermatozoides migram para a espermateca onde são armazenados para a futura fertilização de ovos (Davey 1967). As principais características do comportamento sexual dos triatomíneos já foram descritas para várias espécies e envolvem uma sequência de eventos semelhantes (Lima et al 1986; Rojas et al 1990; Rojas & Cruz-López 1992; Manrique & Lazzari 1994; Garcia-Pérez et al 1997; Manrique & Schilman 2000; Pires et al 2004; Vitta & Lorenzo 2009). Para os machos, esses passos incluem a aproximação, seja caminhando ou mediante um pulo e a conexão de sua genitália com a da fêmea, além da eventual guarda pós-cópula descrita para algumas espécies. Na guarda pós-cópula o macho permanece sobre a fêmea após a cópula (Manrique & Lazzari 1994; Manrique & Schilman 2000; Pires et al 2004; Vitta & Lorenzo 2009) provavelmente para minimizar a competição com outros machos. Interessantemente, a fêmea pode aceitar ou rejeitar as tentativas de cópula do macho, através de diversos comportamentos, tais como a estridulação (pela fricção da probólide no seu sulco ventral), a movimentação lateral do abdômen, o achatamento do corpo contra o substrato ou a fuga (Manrique & Lazzari 1994; Manrique & Schilman 2000; Pires et al 2004; Vitta & Lorenzo 2009).

1.4 *Trypanosoma cruzi*

A família Trypanosomatidae apresenta ampla distribuição geográfica e compreende parasitos obrigatórios de vertebrados, plantas e invertebrados, principalmente os insetos (Moreira et al 2004). Os flagelados pertencentes a essa família foram classificados em 10 gêneros: seis que incluem parasitos exclusivamente de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina* e *Sergeia*), um que abriga parasitos tanto de plantas quanto de insetos (*Phytomonas*) e gêneros com importância médica, cujos representantes necessitam parasitar tanto vertebrados quanto invertebrados (*Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*), principalmente os insetos das ordens Diptera e Hemiptera (Hoare & Wallace 1966; Wallace et al 1983; Merzlyak et al 2001; Svobodová et al 2007). Apesar da maioria das espécies da família Trypanosomatidae não ser patogênica a seus hospedeiros, alguns

representantes são importantes agentes etiológicos de doenças que acometem humanos e animais, como as tripanossomíases africana (doença do sono) e americana (doença de Chagas) e as leishmanioses (Hoare & Wallace 1966; Simpson et al 2006).

Trypanosoma cruzi é um protozoário de grande importância médica que pertence à ordem Kinetoplastida (Hoare & Wallace 1966). Esta espécie de flagelado é capaz de infectar triatomíneos e mais de 100 espécies de mamíferos, que incluem marsupiais, roedores, morcegos, xenartros e primatas, incluindo os humanos (Dias et al 1945; Lisboa et al 2006). Os tripanosomas integrantes dessa família apresentam um flagelo que se origina de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar e uma estrutura próxima ao local de inserção do flagelo, conhecida como cinetoplasto. O cinetoplasto, por sua vez, corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior da mitocôndria única e ramificada que se estende por todo o corpo do protozoário (Brenner et al 2000). A espécie apresenta diversas cepas geneticamente distintas (Tibayrenc 1995) que apresentam variações na sua morfologia, infectividade, patogenicidade e virulência (Freitas et al 2006; ver revisão Manoel-Caetano & Silva 2007). Até o momento não se sabe se existem correlações claras entre as linhagens e clones descritos para *T. cruzi* e as diversas manifestações clínicas apresentadas pela doença de Chagas (Brisse et al 2000; Manoel-Caetano & Silva 2007). Adicionalmente, ainda é pouco conhecido se existem diferenças na susceptibilidade de hospedeiros às diferentes cepas, tanto no que se refere aos triatomíneos quanto aos mamíferos (Fernandes et al 1999; Yeo et al 2005; Vallejo et al 2009).

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta três formas principais de desenvolvimento: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. As duas primeiras são consideradas formas replicativas do parasito, enquanto a última, infectante (Brenner et al 2000). A figura 2 esquematiza o ciclo biológico de *T. cruzi* no vetor, que se inicia quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto em hospedeiros vertebrados. O parasito se diferencia e divide sob a forma epimastigota no intestino médio posterior do inseto (Ferreira 2014) e finalmente se diferencia em formas tripomastigotas metacíclicas na ampola retal, que poderão ser transmitidas a outros mamíferos no próximo repasto (Garcia & Azambuja 1991; Schuster & Schaub 2000). A transmissão acontece primariamente através da deposição de fezes e urina contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas em mucosas ou na lesão tecidual causada pela picada, durante ou logo após a finalização do repasto sanguíneo. No entanto, cada vez mais, a transmissão oral vem sendo apontada como uma importante forma de circulação de *T. cruzi* entre os mamíferos (Barretto et al 1978; Calvo Mendez et al 1992; Roque et al 2008; Sánchez & Ramírez 2013). Uma vez na corrente sanguínea, as formas tripomastigotas podem invadir diferentes células

do vertebrado, aonde se diferenciarão em formas amastigotas. As fomas amastigotas, por sua vez, poderão se multiplicar por divisão binária e se transformar em tripomastigotas sanguíneas que ao caírem na circulação sanguínea, podem ser ingeridos pelos triatomíneos (Brener 1973).

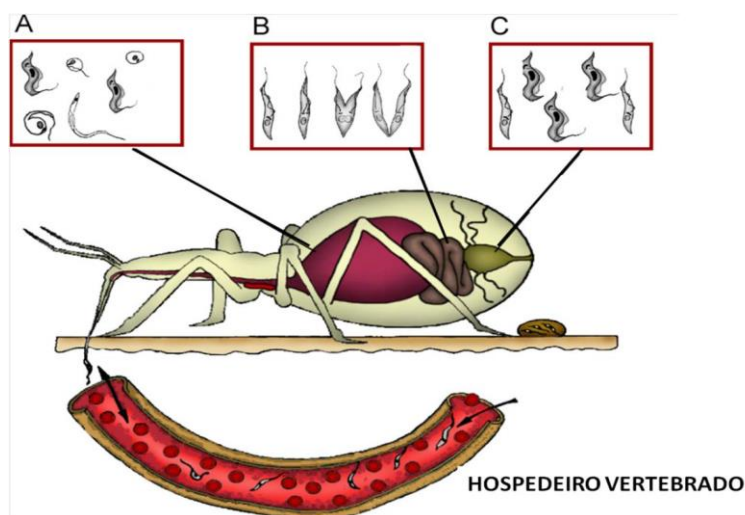


Figura 2 – Ciclo biológico de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado A) formas tripomastigotas sanguíneas no intestino médio anterior; B) formas epimastigotas no intestino médio posterior e C) formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas na ampola retal – Garcia et al 2007.

1.4.1 Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro invertebrado

Existem muitos estudos a respeito dos efeitos de *T. cruzi* nos vertebrados, principalmente no homem, no entanto um menor número de trabalhos avalia o papel do parasito no vetor. A maioria sugere que o parasito não promove efeitos patogênicos (Juarez 1970; Zeledón et al 1970; Schaub 1988a,b; Kollien et al 1998; Eichler & Schaub 2002). Em *T. infestans*, por exemplo, foi mostrado que o parasito não afeta o desenvolvimento (Juarez 1970; Schaub 1988a,b) ou sobrevivência (Schaub 1988b) do inseto. O parasito também não alterou a longevidade nem os parâmetros reprodutivos de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) (Zeledón et al 1970). *Trypanosoma cruzi* também não causou danos no epitélio intestinal de *T. infestans* (Kollien et al 1998) nem alterou a população de simbioses do trato intestinal de *T. infestans* e *R. prolixus* (Eichler & Schaub 2002).

Todavia, alguns autores mostraram que a infecção por *T. cruzi* pode afetar parâmetros biológicos e morfológicos do vetor, existindo variações de acordo com a identidade da cepa e espécie de triatomíneo (Neves & Peres 1975; Lima et al 1992; Oliveira et al 2010). Neves & Peres (1975), ao estudarem *R. prolixus* infectados por *T. cruzi*, não encontraram

alterações na duração do seu desenvolvimento até a fase adulta, mas relataram que a longevidade dos adultos foi reduzida. Foi também observado que o período de produção de ovos foi menor em comparação com o do grupo controle apenas para insetos que receberam uma segunda alimentação infectiva. Entretanto, nos ensaios citados não foi mencionada a cepa empregada, que provavelmente é uma variável importante na determinação da virulência de *T. cruzi*. Além disso, no estudo citado não foram controlados parâmetros relevantes para a fecundidade, como o peso inicial dos insetos e a quantidade de sangue ingerido pelos mesmos.

Em *T. brasiliensis*, a infecção por *T. cruzi* acarretou apenas um atraso no desenvolvimento do primeiro para o segundo estágio ninfal, não tendo sido encontrados efeitos do parasito na sobrevivência nem no período de pré-oviposição, fecundidade e fertilidade dos insetos (Oliveira et al 2010). Lima et al (1992) avaliaram diversos aspectos do desenvolvimento e da reprodução em *P. megistus* infectados por *T. cruzi*. Esses autores encontraram que *T. cruzi* não afetou o desenvolvimento nem o processo de ecdise em nenhum dos estádios ninfais. De acordo com esse estudo, a infecção também não prejudicou a fertilidade dos insetos, reduzindo somente a sobrevivência e a fecundidade. Nouvellet et al (2011) mostraram mudanças morfológicas decorrentes da infecção por *T. cruzi*. Nesse estudo os autores demonstraram que *T. dimidiata* infectados possuem as asas maiores do que insetos não infectados pelo parasito.

Além das mudanças fisiológicas e morfológicas citadas, *T. cruzi* poderia potencialmente causar mudanças no comportamento dos insetos. Os estudos de comportamento em triatomíneos avançaram bastante ao longo das últimas décadas, principalmente no que se diz ao comportamento alimentar, locomotor e sexual (Lazzari & Nunez 1989; Lazzari 1992; Guarneri et al 2002, 2003; Vitta & Lorenzo 2009; Zacharias et al 2010; Pontes & Lorenzo 2012; Soares et al 2014; ver revisão Lazzari et al 2013). No entanto, poucos estudos abordaram o comportamento na interação parasito-triatomíneo (Añez & East 1984; Molyneux & Jefferies 1986; Garcia et al 1994; Botto-Mahan et al 2006; Ramirez-Sierra et al 2010). Alguns desses trabalhos mostram que os triatomíneos infectados por tripanosomatídeos podem apresentar alterações comportamentais. Botto-Mahan et al (2006), por exemplo, estudaram o comportamento alimentar do triatomíneo *Mephaia spinolai* (Porter, 1934) infectados por *T. cruzi* e viram que os insetos infectados picavam mais vezes e defecavam mais rapidamente. Ramirez-Sierra et al (2010), estudando *T. dimidiata*, encontraram diferenças na distribuição espacial de fêmeas infectadas em comparação às não infectadas e sugeriram que isso possa interferir nos parâmetros de

dispersão desses insetos. Em geral, mudanças comportamentais nos vetores induzidas pelos parasitos podem alterar as taxas de transmissão e, conseqüentemente, causar modificações na dinâmica dos ciclos das doenças (Garcia et al 1994; Hurd 2005; Botto-Mahan et al 2006). Por esse motivo, para melhor compreensão do tema e de suas conseqüências são necessários estudos de comportamento de triatomíneos no contexto da interação *T. cruzi*- triatomíneo.

Os insetos, por outro lado, podem dispor de mecanismos para se proteger dos parasitos, o que pode comprometer a sobrevivência dos microrganismos. Ferreira (2014) mostrou que, em *R. prolixus*, grande parte das formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas juntamente com o repasto são eliminadas no intestino médio anterior ainda nas primeiras 24h pós-infecção. A trialisina, uma proteína produzida nas glândulas salivares de alguns triatomíneos, como *T. infestans*, é capaz de lisar as células dos protozoários no tubo digestivo dos insetos. Como essa proteína induz lise de tripomastigotas de *T. cruzi*, é possível que em parte, isso possa explicar a eliminação de algumas linhagens já no princípio da infecção (Amino et al 2002). Como conseqüência da digestão sanguínea os triatomíneos liberam grandes quantidades de heme, um grupo prostético essencial para o metabolismo de *T. cruzi*. Os triatomíneos conseguem permanecer em jejum por longos períodos e esse processo pode influenciar nas densidades populacionais dos parasitos dentro dos vetores diante da falta de nutrientes para o hospedeiro e os flagelados. Sabe-se também que os insetos podem eliminar a infecção por *T. cruzi* após períodos de jejum prolongados, e isso irá depender de fatores tais como a cepa em questão e a duração da infecção (Schaub & Böker 1986). Os triatomíneos são determinantes na transmissão de *T. cruzi* e na disseminação da doença de Chagas. Por isso, a importância de estudos que ampliem o conhecimento das interações parasito-hospedeiro, fundamental para a compreensão dos mecanismos de defesa dos insetos e àqueles envolvidos na sobrevivência dos parasitos.

Apesar dos muitos trabalhos citados, pouco se sabe sobre a interação triatomíneo-*T. cruzi*. Em relação à patogenicidade, como mencionado anteriormente, a maioria dos trabalhos mostra que estes parasitos não afetam os insetos. Além disso, os triatomíneos podem permanecer infectados por longos períodos no ambiente silvestre e estão sujeitos às variações ambientais. Outro aspecto que pode influenciar a interação é a densidade dos parasitos. Sabe-se que o crescimento de *T. cruzi* em cultura é diretamente influenciado pela temperatura ambiental (Rodrigues 2013). Desse modo, é provável que a carga parasitária de insetos mantidos em diferentes regimes de temperatura varie de maneira significativa. Assim, investigações sistematizadas que analisem períodos prolongados de infecção em diferentes

temperaturas são necessárias para uma melhor elucidação do potencial efeito de *T. cruzi* sobre os vetores.

1.5 *Trypanosoma rangeli*

Trypanosoma rangeli Tejera, 1920, é outro protozoário hemoflagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida (Levine 1994). Este parasito pode ser encontrado na maioria dos países da América Latina onde apresenta uma distribuição sobreposta à de *T. cruzi* (Machado et al 2001). As duas espécies compartilham diversos reservatórios e vetores, possibilitando, portanto a ocorrência de infecções mistas em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados (Guhl et al 1987; Grisard et al 1999; Machado et al 2001; Ramirez et al 2002). Apesar de não causar doença aos mamíferos, incluindo o homem, a infecção por *T. rangeli* promove uma resposta imunológica com formação de anticorpos. Uma vez que este parasito compartilha com *T. cruzi* cerca de 60% dos seus antígenos solúveis de superfície (Afchain 1979) existe a possibilidade de ocorrência de reatividade sorológica cruzada para essas espécies, o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo da doença de Chagas (Hudson et al 1988; O'Daly et al 1994; Moraes et al 2008). O diagnóstico do parasito em humanos é possível através de exames parasitológicos (Guhl 2001), técnicas sorológicas (Garnham 1980; Guhl 1990) e moleculares (Vallejo et al 1999; Guhl et al 2002).

Diferentemente de *T. cruzi*, o ciclo de *T. rangeli* é pouco conhecido no hospedeiro vertebrado. Contudo, diversas ordens de mamíferos foram descritas como sendo reservatórios silvestres do parasito: Xenarthra, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (D'Alessandro 1976; D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992; Cuba Cuba 1998). Alguns estudos mostram que a parasitemia nesses animais é muito baixa e que os parasitos desaparecem ao longo do tempo, o que sugere que não ocorre replicação intracelular (Molyneux 1973; Eger-Mangrich et al 2001). Nos humanos, a infecção também é caracterizada por baixos níveis de parasitemia, ausência de sintomas e de formas replicativas tanto nos tecidos quanto na corrente sanguínea (D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo completo de *T. rangeli*, até onde se conhece, ocorre somente em insetos do gênero *Rhodnius*. Em insetos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*, quando presente, *T. rangeli* parece ser restrito ao trato digestivo, não atingindo a hemolinfa e as glândulas salivares (Lucena & Vergetti 1973; Gregorio & Ratcliffe 1991b; Steindel et al 1991). A susceptibilidade de triatomíneos desse gênero poderia ser explicada pela baixa concentração de aglutininas (glicoproteínas com capacidade de aglutinar diferentes

células alvo, como os protozoários) em seu sistema digestivo (Gregorio & Ratcliffe 1991a,b) em comparação às altas concentrações nos insetos do gênero *Triatoma*. Apesar de não existir evidência de atividade lítica das aglutininas contra *T. rangeli*, as mesmas associadas a outras moléculas, poderiam conferir maior resistência ao desenvolvimento do parasito no intestino de *T. infestans* (Gregório & Ratcliffe 1991a).

Assim como ocorre com *T. cruzi*, o ciclo do parasito no vetor se inicia com a ingestão de tripomastigotas sanguíneos juntamente com um repasto obtido de um mamífero infectado. Dentro do intestino do inseto, os parasitos se diferenciam em formas longas e curtas de epimastigotas que se dividem binariamente. Entretanto, diferentemente de *T. cruzi* que permanece restrito ao tubo digestivo, *T. rangeli* pode atravessar o epitélio intestinal e alcançar a cavidade celômica. Uma vez na hemocele, os parasitos se multiplicam e podem migrar para as glândulas salivares, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são transmitidos ao próximo hospedeiro vertebrado no momento da picada (Figura 3; D'Alessandro 1976; D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992; Gomes et al 1999). Entre os insetos que ingerem as formas sanguíneas do parasito, a proporção daqueles que apresentam o parasito também na hemocele e glândulas salivares é bastante variável, não ultrapassando os 50%. O epitélio intestinal é uma das principais barreiras do inseto contra este parasito (Tobie 1965, 1970; Marinkelle 1968; Añez et al 1987; Hecker et al 1990; Gomes et al 2002).

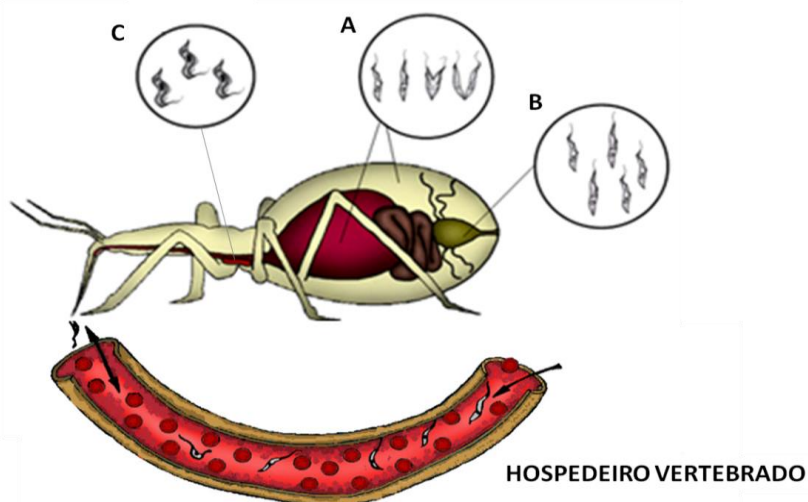


Figura 3 – Ciclo biológico de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado A) formas tripomastigotas sanguíneas e epimastigotas no intestino médio anterior e epimastigotas na hemocele; B) formas epimastigotas na ampola retal C) formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas na glândula salivar – Adaptado de Garcia et al 2007 e <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=89>.

1.5.1 Interação *Trypanosoma rangeli*-hospedeiro invertebrado

Trypanosoma rangeli é capaz de promover diferentes níveis de patogenicidade para o vetor, que podem afetar drasticamente a sua fisiologia (Brecher & Wigglesworth 1944; Grewal 1957; Lake & Friend 1967; Tobie 1970; D'Alessandro 1976; Eichler & Schaub 1998). Poucos trabalhos relataram ausência de danos nos insetos (D'Alessandro & Mandel 1969; Tovar et al 1989). Grewal (1957) observou que ninfas de *R. prolixus* infectadas com *T. rangeli* frequentemente morrem ou apresentam problemas durante a ecdise e, se conseguem chegar a fase adulta, apresentam anomalias morfológicas. Watkins (1971) relatou diversas alterações morfológicas em *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*, dentre elas: nas asas, nas pernas, no corpo gorduroso e nos nervos. Foi mostrado também que *R. prolixus* coletados em campo já com a infecção estabelecida, morrem mais rapidamente do que os coletados sem a infecção (Gomez 1967). Coincidentemente, Tobie (1965) e Añez (1984) demonstraram que o parasito promove uma diminuição na sobrevivência de ninfas de *R. prolixus*. Esses trabalhos, em sua maioria, estão relacionados à sobrevivência (Gomez 1967; Marinkelle 1968) e danos morfológicos (Grewal 1957; Watkins 1971), mas há estudos que mostram sua capacidade de interferir também na população de simbiossomas dos insetos (Watkins 1969; Eichler & Schaub 2002; Figueiredo et al 2008). Os triatomíneos dependem de bactérias simbiossomas que são responsáveis pela produção de nutrientes essenciais ausentes na dieta sanguínea (Eichler & Schaub 1998; Eichler & Schaub 2002). A alteração desses simbiossomas causa diversos danos, que incluem o prolongamento do desenvolvimento das ninfas (Brecher & Wigglesworth 1944; Lake & Friend 1967), o aumento das taxas de mortalidade (Harrington 1960) e distúrbios digestivos (Baines 1956). Foi demonstrado que *T. rangeli* interfere com a microbiota dos triatomíneos reduzindo sua população e, com isso, promove efeitos negativos diretos e indiretos no *fitness* dos insetos (Watkins 1969). Além dos efeitos negativos no *fitness*, o parasito também é capaz de causar alterações no comportamento alimentar dos vetores. Quando as glândulas salivares de *R. prolixus* estão infectadas por *T. rangeli*, os insetos precisam aumentar o número de sondagens, sua habilidade de sugar o sangue dos hospedeiros é reduzida e, com isso, eles gastam mais tempo durante a alimentação (Añez & East 1984; Garcia et al 1994). Paim et al (2013) mostraram que em *R. prolixus* infectados por *T. rangeli*, ocorre uma diminuição nas proteínas totais e hemeproteínas da saliva que poderiam justificar essas mudanças comportamentais.

De modo geral, assim como o que ocorre em outras interações, no processo evolutivo da interação entre triatomíneos e tripanosomatídeos, existem estratégias de sobrevivência de

ambas as partes. Os mecanismos de defesa dos triatomíneos de um lado atenuam o efeito dos protozoários, enquanto os mesmos apresentam mecanismos de escape que garantem seu desenvolvimento (Gaunt & Miles 2000; Garcia et al 2007). Alguns trabalhos sobre a interação de *T. rangeli* com triatomíneos relatam que o parasito possui mecanismos de escape que o protegem das respostas imunes humorais e celulares do inseto (Tobie 1965, 1970). No entanto, diversos trabalhos mais atuais mostram que vários desses mecanismos do inseto agem e limitam o desenvolvimento deste parasito logo após o início da infecção (Takle 1988; Mello et al 1995; Gomes et al 1999; Oliveira & Souza 2003). Uma vez na hemolinfa, o parasito pode desencadear a ativação de mecanismos de defesa do vetor, tais como a fagocitose e a microagregação de hemócitos (Takle 1988), a atividade tripanolítica (Gomes et al 1999) e a aglutinação (Mello et al 1995), que podem comprometer o protozoário. Com o decorrer da infecção na hemolinfa, ocorre a diminuição das defesas humorais e celulares do inseto que coincidem com o desaparecimento das formas curtas dos parasitos (Feder et al 1999; Garcia et al 2004). Por outro lado, as formas longas seriam capazes de escapar dos mecanismos de defesa do vetor, manter a infecção, sendo capazes de migrar para as glândulas salivares (Mello et al 1995; Gomes et al 1999, Gomes et al 2003; Figueiredo et al 2008). Esses e outros fatores em conjunto, modulam a dinâmica da transmissão dos parasitos e, por isso, são necessários estudos em diversas áreas do conhecimento para melhor compreensão das interações ecológicas entre hospedeiros e parasitos (Guinnee & Moore 2004; Hurd 2005).

A maioria dos estudos indica que *T. rangeli*, diferentemente de *T. cruzi*, afeta negativamente o *fitness* dos triatomíneos. Entretanto é possível que o efeito desse protozoário no inseto ainda seja, até o presente momento, subestimado. A avaliação do efeito da infecção em determinados aspectos comportamentais e na sua biologia reprodutiva, por exemplo, ainda não foi realizada. Por esse motivo, a investigação do potencial efeito do parasito nesses aspectos pode ser fundamental para melhorar nosso conhecimento e elucidar aspectos ainda pouco estudados da interação de *T. rangeli* com seus hospedeiros.

1.6 *Rhodnius prolixus*

O gênero *Rhodnius* (Reduviidae) é composto de 14 espécies, todas vetoradas de *T. cruzi*, mas com diferentes graus de importância epidemiológica (Schofield & Dujardin 1997). Essas espécies formam três clados dos quais o complexo *prolixus* (Barrett 1988), inclui quatro

espécies: *R. prolixus*, *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927, *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 e *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Schofield & Dujardin 1999).

Rhodnius prolixus, além de poder transmitir *T. cruzi* para os mamíferos, incluindo o homem, pode também abrigar *T. rangeli* e ainda infecções mistas de *T. cruzi* e *T. rangeli* (Hudson et al 1988; Moraes et al 2008). Atualmente, *R. prolixus* é o principal vetor doméstico da doença de Chagas na Venezuela e Colômbia (Schofield & Galvão 2009). O inseto tem elevada capacidade reprodutiva, possuindo até três gerações anuais. Até recentemente, *R. prolixus* também era considerado o principal vetor da doença em partes da América Central como a Guatemala, Nicarágua, El Salvador e Honduras (Schofield 1994). Na América Central as populações de *R. prolixus* parecem ser totalmente confinadas aos ambientes doméstico e peridoméstico, e sugere-se que tenham sido acidentalmente introduzidas no continente (Zeledón 2004, Hashimoto & Schofield 2012). Recentemente foi relatado que a América Central interrompeu a transmissão da doença de Chagas por *R. prolixus* (Hashimoto & Schofield 2012). Diferentemente, na Venezuela e na Colômbia (Figura 4), além das populações domésticas e peridomésticas, têm sido reconhecidas também populações silvestres de *R. prolixus*. Essas populações são encontradas em palmeiras, que representam seu ecótopo original, no qual se associam aos hospedeiros roedores e aves que coabitam essas árvores (Gamboa 1963; Lent & Wygodzinsky 1979; Schofield 1994; Dujardin et al 1998; Pinho et al 1998; Noireau et al 2005).

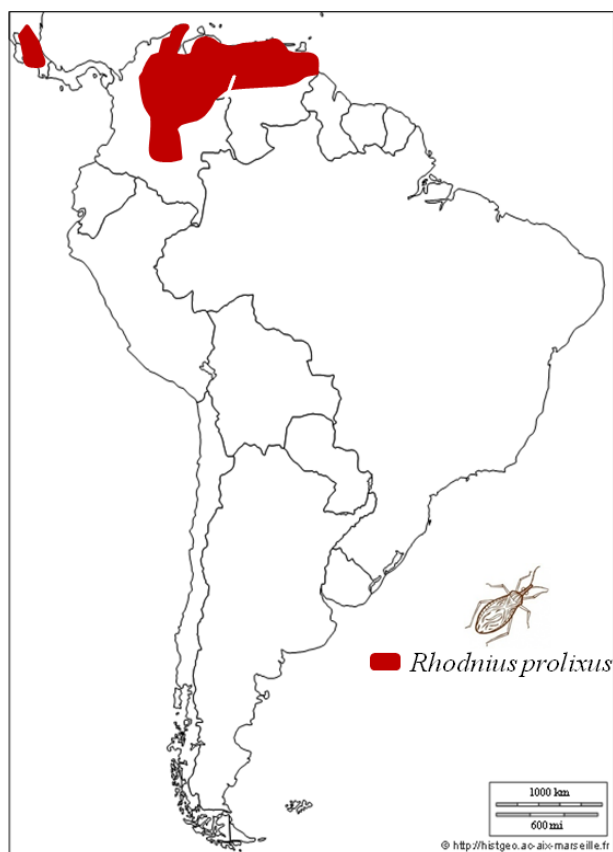


Figura 4 – Distribuição geográfica de *R. prolixus* na América do Sul e Central - Adaptado de Cuba Cuba 1998; Pontes 2010.

Além da sua importância epidemiológica, *R. prolixus* é conhecido como um importante modelo de laboratório para estudos de fisiologia de insetos. Desde 1930, Wigglesworth VB, considerado o principal criador da fisiologia de insetos, fez importantes descobertas em diversas áreas como a anatomia, a fisiologia e a endocrinologia utilizando esse inseto como seu principal modelo experimental (Wigglesworth 1934, 1936, 1964; ver revisão Edwards 1998). Uma das principais contribuições do autor foi a elucidação do papel das *corpora allata* e do hormônio juvenil no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (Wigglesworth 1936). Adicionalmente, além de ser um dos modelos clássicos em estudos de fisiologia, *R. prolixus* tolera bem procedimentos cirúrgicos (Davey 2007). O inseto é de fácil criação em laboratório, tem um ciclo de vida de três a quatro meses, relativamente curto quando em comparação com o de outros triatomíneos (Schofield 1994).

Nesta tese, foi avaliado o efeito da infecção por tripanosomas em aspectos do *fitness* e comportamentais de adultos de *R. prolixus*. É difícil compreender se os efeitos observados dos parasitos em seus hospedeiros são consequência de uma manipulação dos parasitos

visando sua transmissão mais eficiente para novos hospedeiros (Poulin et al 2005; Thomas et al 2005), o que aumentaria o *fitness* dos parasitos, ou se são simplesmente consequências fisiológicas da competição por nutrientes do hospedeiro. Apesar da complexidade e da dificuldade de definição precisa, *fitness* é usualmente definido como a capacidade de sobreviver e reproduzir para transmitir os genes para a futura geração (Hamilton 1964a,b; Ridley 1996). Espera-se que esse trabalho possa aumentar o conhecimento existente da interação vetor-parasito e que possa fornecer bases para o desenvolvimento de estratégias e ferramentas de controle mais efetivas e racionais para esses vetores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito das infecções por *T. cruzi* ou *T. rangeli* sobre aspectos do *fitness* de adultos de *R. prolixus*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar potenciais efeitos das infecções no (a):

- período de pré-oviposição, fecundidade e fertilidade de pares;
- qualidade de ovos – peso, comprimento, largura e quantidade de proteínas totais;
- desenvolvimento de ninfas de primeiro estágio oriundas de pares infectados – tempo até eclosão e sobrevivência ao jejum;
- comportamento de cópula – frequência de cópula, latência para o início e duração da cópula e proporção de escolha de parceiro;
- início de voo de machos e fêmeas - frequência e razão entre fracasso/sucesso.

3 MÉTODOS

3.1 Triatomíneos

Foram utilizados *R. prolixus* adultos provenientes de uma colônia de laboratório derivada de insetos coletados há aproximadamente 30 anos em Honduras. A colônia é atualmente mantida no insetário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) pelo grupo Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos. Os insetos foram criados em recipientes de plástico, com base de 17 cm de diâmetro e altura de 20 cm. Os frascos tiveram seu fundo forrado com papel filtro circular e sanfonas de cartolina foram disponibilizadas no seu centro para aumentar a superfície interna oferecida como substrato aos insetos. Os recipientes foram fechados com tecido de algodão de malha fina preso com elásticos de látex na borda dos mesmos para permitir a alimentação dos insetos. As colônias foram mantidas em condições semi-controladas de temperatura e umidade ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. $60\pm 10\%$) e iluminação natural. Os insetos foram alimentados em camundongos suíços de aproximadamente 30 gramas e anestesiados intraperitonealmente com 150 μl de solução de Thiopental 2,5% (Cristália - Brasil) de acordo com as normas de uso de animais em pesquisa da Fiocruz (Comite de Ética no Uso de Animais - CEUA L058/08).

3.2 Preparação dos parasitos

Para infectar os insetos foram utilizadas formas epimastigotas das cepas CL de *T. cruzi* e CHOACHI de *T. rangeli* isoladas respectivamente de *T. infestans* do sul do Brasil (Brenner & Chiari 1963) e de *R. prolixus* da Colômbia (Schottelius 1987), naturalmente infectados. Ambas as cepas foram cultivadas através de duas passagens semanais em meio LIT (infusão de fígado triptose) suplementado com soro fetal bovino 15%, 100 mg/ml de estreptomicina e 100 unidades/ml de penicilina (Ferreira et al 2010). As cepas foram mantidas em BOD a uma temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para manter a infectividade dos parasitos, a cada três meses as cepas foram submetidas a passagens em camundongos e recuperadas através de hemocultura. Para os experimentos foram utilizados parasitos obtidos de culturas com 7-10 dias.

3.3 Preparação do sangue para as infecções

Para infectar os insetos, tanto com *T. cruzi* quanto com *T. rangeli*, foi utilizado sangue de coelho citratado preparado pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ). Primeiramente, o sangue citratado foi colocado em tubos cônicos de polipropileno de 50ml e centrifugado (Eppendorf 5804 R, Alemanha). O plasma foi então separado das hemácias e o sistema complemento inativado a 56°C por 30 minutos e posteriormente centrifugado, sendo o *pellet* descartado. As hemácias foram lavadas três vezes em PBS estéril (0,15 M de NaCl, 0,01 M de NaH₂PO₄, pH 7,4) e novamente misturadas ao plasma para recomposição do sangue.

3.4 Infecção por *T. cruzi*

Para infectar os insetos com *T. cruzi* foram utilizadas ninfas de 2º estágio com jejum entre 8-10 dias. Sangue de coelho citratado foi oferecido aos insetos em alimentadores artificiais de vidro (Figura 5) cobertos com membrana de látex. Os alimentadores foram mantidos a 36,5±1°C por meio de um banho-maria com circulação de água. O sangue “infectado” continha 5x10⁶ parasitos/ml num volume final de cinco ml, enquanto os insetos controle receberam somente sangue no mesmo volume. O sangue foi homogeneizado a cada 20 minutos para que os parasitos e as hemácias ficassem igualmente distribuídos na solução.



Figura 5 – Alimentador artificial acoplado a banho-maria (à esquerda) e alimentação de insetos no alimentador (à direita, Fotos: M^a Raquel Fellet).

Após a infecção por *T. cruzi*, os insetos foram separados em dois grupos: um de insetos criados a 25°C durante o período ninfal e também depois da muda imaginal (infectados e controle), denominados 25-25°C e outro mantido em 30°C durante o desenvolvimento ninfal e transferido para 25°C após a muda imaginal (infectados e controle), denominados 30-25°C. O grupo mantido a 30°C foi montado com o objetivo de se tentar obter insetos com uma maior carga parasitária, uma vez que Rodrigues (2013) demonstrou uma maior taxa de crescimento dos parasitos em cultura nessa temperatura. Todos os grupos foram mantidos em um ciclo de iluminação de 12:12 L/E. Os insetos foram alimentados em camundongos anestesiados, 8-10 dias após cada mudança de estágio a fim de manter a continuidade da infecção (Schaub & Böker 1986; Kollien & Schaub 1998). A confirmação da infecção foi feita através do exame do material liberado durante o processo de diurese quando as ninfas alcançaram o 3º estágio. As mesmas foram colocadas em tubos de polipropileno de 0,5ml para a coleta da diurese e, em seguida, o material foi depositado sobre uma lâmina de vidro e observado em microscópio óptico (aumento 400x).

Os primeiros ensaios realizados nesta tese com infecções por *T. cruzi* foram os de fecundidade e fertilidade e cópula sem escolha. Como nesses ensaios não foram encontrados efeitos negativos no tratamento 25-25°C, para os ensaios posteriores (qualidade de ovos e ninfas, cópula com escolha e início de voo), foram utilizados somente insetos infectados por *T. cruzi* 30-25°C.

3.5 Infecção por *T. rangeli*

Para infectar os insetos por *T. rangeli* foram utilizadas ninfas de 3º estágio com jejum entre 8-10 dias. Foi oferecida aos insetos uma alimentação infectiva com sangue inativado de coelho citratado em alimentador artificial, de acordo com o descrito anteriormente, contendo 1×10^5 epimastigotas de cultura/ml. Os insetos controle foram alimentados somente com sangue.

Para garantir infecções completas, uma vez que a porcentagem de insetos em que os parasitos atravessam o epitélio intestinal é baixa, as ninfas infectadas oralmente receberam um inóculo contendo epimastigotas de cultura 7-10 dias após a muda para o 4º estágio. Para o inóculo utilizou-se uma seringa de 50 µl (Hamilton, agulha de 13 x 3,30; ½'') acoplada a um dispensador (Hamilton). Na membrana lateral do tórax de cada inseto foi inoculado um µl de PBS estéril contendo $2,5 \times 10^4$ epimastigotas/ml (Figura 6). Os insetos do grupo controle foram inoculados com um µl de PBS estéril. Vinte e quatro horas após o inóculo, todos os

insetos foram alimentados *ad libitum* em camundongos anestesiados. As alimentações subsequentes dos insetos também foram feitas em camundongos anestesiados. Os insetos dos dois grupos foram posteriormente mantidos em estufa BOD com temperatura de 25°C e ciclo de iluminação de 12:12 L/E. Todos os experimentos com infecção por *T. rangeli* foram realizados e mantidos na temperatura descrita e foram denominados 25-25°C. Não foram realizados experimentos com insetos infectados com *T. rangeli* e expostos a 30°C devido ao fato de que ensaios anteriores realizados no nosso laboratório mostraram que a taxa de crescimento da cultura desses parasitos, no intervalo de 20-30°C, apresenta um pico em temperaturas intermédias (i.e., 25°C).



Figura 6 – Inóculo de ninfas de 4º estágio de *R. prolixus* (Foto: Luciana Ferreira).

A confirmação da infecção foi feita uma semana antes dos experimentos, através do exame a fresco de uma amostra de hemolinfa. Para tal, o final de um dos tarsos do último par de pernas do inseto foi cortado e a gota de hemolinfa obtida foi colocada sobre uma lâmina de vidro e examinada em microscópio óptico (aumento de 100x). Somente insetos positivos foram utilizados nos ensaios. Para garantir a uniformidade dos tratamentos, os insetos do grupo controle também tiveram o final de um dos tarsos posteriores cortado e uma gota de hemolinfa retirada.

Para todos os experimentos, tanto com insetos infectados por *T. cruzi* quanto por *T. rangeli*, as infecções foram feitas em estádios iniciais do desenvolvimento dos insetos a fim de ser gerado um perfil patológico crônico nos insetos. Nesse sentido, a avaliação do desempenho reprodutivo em adultos infectados em estádios mais jovens permitiria mostrar efeitos acumulados ao longo de sua vida. Diferentemente das infecções por *T. cruzi*, as

infecções por *T. rangeli* foram iniciadas no 3º estágio, uma vez que o diâmetro da agulha usada nos inóculos gera mortalidade em ninfas menores do que o tamanho alcançado no 4º estágio. Em adição, até o presente momento, não existem evidências de que a virulência de tripanosomas possa ser dependente do estágio ninfal em que é feita a infecção.

3.6 A infecção por tripanosomas sobre a fecundidade e fertilidade de *R. prolixus*

3.6.1 Desenho experimental

Esse experimento foi desenhado com a finalidade de verificar se existem diferenças na fecundidade e fertilidade de pares infectados por *T. cruzi* ou *T. rangeli* quando comparados com pares do grupo controle. Para tal, ninfas de 5º estágio infectadas ou controle foram individualizadas e quinze dias após a ocorrência da ecdise, os adultos foram individualmente pesados e alimentados *ad libitum* em camundongos anestesiados. Imediatamente após a alimentação, os insetos foram pesados novamente e pares foram formados e transferidos para frascos de plástico (5,5 cm de diâmetro e 8 cm de altura), com o fundo recoberto com papel filtro e o interior preenchido com sanfona de cartolina. Os potes foram cobertos com malha de algodão presa com elástico de borracha. Cada par permaneceu nos recipientes por 21 dias e após esse período, uma nova alimentação sanguínea foi oferecida, sendo os insetos pesados antes e imediatamente após a alimentação. Cada período correspondente a 21 dias foi denominado de ciclo, tendo sido avaliados três ciclos consecutivos para cada par. Os insetos permaneceram em estufa BOD com temperatura de 25°C e ciclo de iluminação de 12:12 L/E até o fim dos experimentos (três ciclos) ou até a morte da fêmea. Os machos mortos não foram substituídos e as fêmeas foram mantidas sozinhas até o final dos experimentos. Somente os dados gerados a partir de insetos que se alimentaram em cada ciclo foram considerados para o experimento.

Para analisar se a infecção com tripanosomas promove um efeito na fecundidade e fertilidade de adultos de *R. prolixus* foi desenvolvido um experimento que incluiu insetos expostos aos seguintes tratamentos:

- T. cruzi*: (1) Fêmea e macho controle mantidos a 25-25°C (n=15 pares)
(2) Fêmea e macho infectados mantidos a 25-25°C (n=19 pares)
(3) Fêmea e macho controle mantidos a 30-25°C (n=20 pares)
(4) Fêmea e macho infectados mantidos a 30-25°C (n=20 pares)

T. rangeli: (1) Fêmea e macho controle mantidos a 25-25°C (n=20 pares)

(2) Fêmea e macho infectados mantidos a 25-25°C (n=20 pares)

3.6.2 Avaliação dos ensaios

Diariamente, os ovos postos por cada par foram separados e distribuídos em placas de acrílico de 24 poços que foram fechadas com tampas apropriadas. Foram analisados os seguintes parâmetros:

- 1) Período de pré-oviposição (tempo transcorrido desde a alimentação até a primeira postura)
- 2) Taxa de eclosão de ovos em cada um dos ciclos
- 3) Valor E do casal para cada um dos ciclos (Valor E*, Davey 1987; Guarneri et al 2000)

*O valor E é uma variável que indica a capacidade de conversão do sangue ingerido na produção de ovos, levando-se em consideração o peso inicial da fêmea. Essa variável é calculada através da fórmula:

$$\text{Valor E} = \frac{\text{número de ovos postos}}{\text{Peso inicial da fêmea} \times \text{sangue ingerido}} \times 1000$$

3.7 A infecção por tripanosomas na qualidade de ovos e ninfas de primeiro estágio de *R. prolixus*

Para avaliar se a presença de *T. cruzi* ou de *T. rangeli* afeta a qualidade dos ovos postos por adultos infectados, um grupo com 10 pares infectados e outro com 10 pares controle foram formados para avaliar os efeitos de cada espécie de tripanosoma. Os insetos foram alimentados 15 dias após a muda imaginal e nove dias depois todos os ovos postos foram retirados e descartados. No 10º dia, os ovos foram recolhidos, garantindo assim, que os mesmos tivessem menos de um dia de idade (de 0 a 14 horas). Os ovos retirados foram utilizados para a determinação de peso, comprimento e largura, quantidade de proteínas e sobrevivência de ninfas após a eclosão. Para cada uma das análises os ovos foram coletados de maneira randômica.

Os seguintes tratamentos foram realizados:

T. cruzi: (1) Ovos provenientes do grupo de pares controle mantidos a 30-25°C (n=30 ovos)

(2) Ovos provenientes do grupo de pares infectados mantidos a 30-25°C (n=30 ovos)

T. rangeli: (1) Ovos provenientes do grupo de pares controle mantidos a 25-25°C (n=30 ovos)

(2) Ovos provenientes do grupo de pares infectados mantidos a 25-25°C (n=30 ovos)

3.7.1 Peso e medidas

Ovos de cada grupo (controle e infectado) foram colocados individualmente em poços de placas de acrílico distintas para cada tratamento. Cada ovo foi pesado em balança analítica com precisão de 0,01 mg (Shimadzu série AUW220D). Posteriormente, a imagem dos ovos foi registrada digitalmente para medição do seu comprimento e largura (câmera AxioCam MRn digital e Software AxioVision versão LE 4.8.1 (Carl Zeiss GmbH, Goettingen, Alemanha).

3.7.2 Determinação da quantidade de proteínas totais

A quantidade de proteínas totais de ovos postos por pares controle e infectados foi medida através da técnica de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão. Os ovos foram individualmente colocados em tubos cônicos de polipropileno de 1,5ml, macerados em um ml de PBS e centrifugados por 5 minutos em 12000g (Eppendorf 5804 R, Alemanha). Vinte microlitros do sobrenadante foram utilizados para a leitura.

3.7.3 Tempo até a eclosão e sobrevivência ao jejum de ninfas recém eclodidas

Para avaliar se o período embrionário e resistência ao jejum de ninfas provenientes de adultos infectados eram alterados, 30 ovos de cada tratamento (pares infectados ou não) foram individualmente armazenados em poços de placas de acrílico. As placas foram acondicionadas em BOD (25°C±1) e os ovos foram avaliados diariamente para o registro da duração do seu desenvolvimento. Após a eclosão dos ovos, as ninfas foram mantidas nas mesmas condições, sem alimentação, para avaliar potenciais efeitos sobre o tempo de sobrevivência.

3.8 A infecção por tripanosomas e o comportamento de cópula de *R. prolixus*

Nesse experimento foram avaliados os possíveis efeitos da infecção por *T. cruzi* ou *T. rangeli* sobre o comportamento sexual e a frequência de cópula de *R. prolixus* segundo metodologia descrita por Vitta (2009) e Vitta & Lorenzo (2009). Para isso, ninfas de 5º estágio foram individualizadas até a muda imaginal. Quinze dias após a ecdise, os adultos foram alimentados *ad libitum* em camundongos anestesiados e mantidos individualmente por mais sete dias, quando os ensaios foram realizados.

Os ensaios foram realizados em arenas de vidro (14 cm de diâmetro e 10 cm de altura) (Figura 7). O fundo da arena era coberto com papel filtro trocado a cada novo ensaio. Os ensaios foram desenvolvidos nas três primeiras horas da escotofase, período de maior atividade dos triatomíneos (Lazzari 1992). A sala de experimentação permaneceu em penumbra, iluminada com luz branca difusa, somente o suficiente para a observação direta e anotação dos dados.



Figura 7 – Arena de vidro para o ensaio de cópula (à esquerda) e par em cópula (à direita, Fotos: M^a Raquel Fellet).

Primeiramente uma fêmea e posteriormente um macho foram liberados na arena com o auxílio de tiras de papel utilizadas como suporte (um para cada tratamento e sexo). Caso o par não iniciasse a cópula dentro de um período de 20 minutos, o mesmo era substituído e o dado registrado.

Foram desenvolvidas as seguintes séries experimentais:

T. cruzi: (1) Fêmea e macho controle mantidos a 25-25°C (n=15 pares)

(2) Fêmea e macho infectados mantidos a 25-25°C (n=15 pares)

(3) Fêmea infectada e macho controle mantidos a 25-25°C (n=15 pares)

(4) Fêmea controle e macho infectado mantidos a 25-25°C (n=15 pares)

(5) Fêmea e macho controle mantidos a 30-25°C (n=15 pares)

(6) Fêmea e macho infectados mantidos a 30-25°C (n=15 pares)

(7) Fêmea infectada e macho controle mantidos a 30-25°C (n=15 pares)

(8) Fêmea controle e macho infectado mantidos a 30-25°C (n=15 pares)

T. rangeli: (1) Fêmea e macho controle mantidos a 25-25°C (n=17 pares)

(2) Fêmea e macho infectados mantidos a 25-25°C (n=17 pares)

(3) Fêmea infectada e macho controle mantidos a 25-25°C (n=17 pares)

(4) Fêmea controle e macho infectado mantidos a 25-25°C (n=17 pares)

Os comportamentos apresentados durante a cópula foram observados e os seguintes eventos foram registrados:

1) Ocorrência de cópula: quando houve o contato e permanência das genitálias feminina e masculina.

2) Latência para o início da cópula: tempo transcorrido entre a liberação do macho na arena e o contato das genitálias.

3) Duração da cópula: tempo entre o contato e a interrupção do contato das genitálias do par.

3.9 A infecção por tripanosomas na escolha do parceiro para a cópula

Para avaliar se a infecção por tripanosomas induz efeitos sobre a escolha de parceiro sexual, a padronização dos adultos e dos ensaios foi realizada como descrito no item 3.8. Nesse experimento, entretanto, um inseto adulto não infectado (macho ou fêmea separadamente) tinha a opção de escolher entre dois parceiros, um infectado e outro controle (Figura 8). Primeiramente os insetos a serem escolhidos foram colocados dentro de recipientes de plástico com a borda para baixo na arena experimental, de modo que os insetos ficassem presos. Posteriormente foi colocado o inseto do sexo oposto no lado inverso da arena

experimental. O ensaio se iniciou quando os recipientes de plástico foram erguidos simultaneamente, liberando os insetos (Figura 8 – à esquerda). A opção do parceiro foi confirmada pelo contato e permanência das genitálias femininas e masculinas e visualização de qual indivíduo (controle ou infectado) foi escolhido.

Em todos os tratamentos, a marcação dos insetos foi feita em uma das pernas medianas com a cor branca. Para evitar que a escolha fosse influenciada pela marcação, metade dos insetos tinha marcação na perna mediana direita e a outra metade na perna mediana esquerda.

As seguintes séries experimentais foram realizadas:

T. cruzi: (1) Fêmea não infectada escolhe: um macho controle ou um macho infectado mantidos a 30-25°C (n=20 grupos)

(2) Macho não infectado escolhe: uma fêmea controle ou uma fêmea infectada mantidos a 30-25°C (n=20 grupos)

T. rangeli: (1) Fêmea não infectada escolhe: um macho controle ou um macho infectado mantidos a 25-25°C (n=20 grupos)

(2) Macho não infectado escolhe: uma fêmea controle e uma fêmea infectada mantidos a 25-25°C (n=20 grupos)



Figura 8 – Arena de vidro contendo o inseto a escolher acima e os insetos a serem escolhidos antes da liberação – dentro dos potes de plástico (à esquerda) e par em cópula (à direita, Fotos: M^a Raquel Fellet).

3.10 A infecção por tripanosomas sobre a frequência do início do voo em *R. prolixus*

Os ensaios de voo foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Vitta (2009). Para os ensaios foram utilizados adultos, controle e infectados, individualizados a partir da muda para o 5º estágio. Quinze dias após a ocorrência da muda imaginal, os adultos foram alimentados *ad libitum* em camundongos, e após 15 dias de jejum os ensaios de voo foram realizados.

Os ensaios foram realizados em uma caixa de acrílico de 1 m de comprimento, 50 cm de largura e 50 cm de altura (Figura 9). As duas extremidades da caixa foram fechadas com tela de nylon para permitir a passagem de ar. No centro da caixa foi colocada uma arena de vidro (14 cm de diâmetro e 10 cm de altura) e no seu centro, foi fixada com cola quente uma haste de madeira vertical (14 cm de altura e 2 cm de diâmetro) que funcionou como plataforma de voo para os insetos. As paredes internas da arena foram cobertas com glicerina, fazendo com que os insetos somente pudessem deixar a arena através do voo. Para estimular o início do voo nos insetos, foi apresentada uma corrente de ar gerada por um ventilador fixado no centro de um tubo de PVC (60 cm de comprimento e 7,5 cm de diâmetro). A velocidade da corrente de ar foi controlada por um regulador de voltagem, gerando um fluxo de ar de 12 cm/s mensurado com um anemômetro (Testo 405-V1, Alemanha). Para a calibração da velocidade o sensor do anemômetro foi posicionado no topo da haste, onde os insetos deveriam iniciar o voo. A extremidade do tubo gerador da corrente de ar foi mantida a 50 cm de distância do topo da haste de madeira, posicionado em direção à mesma.

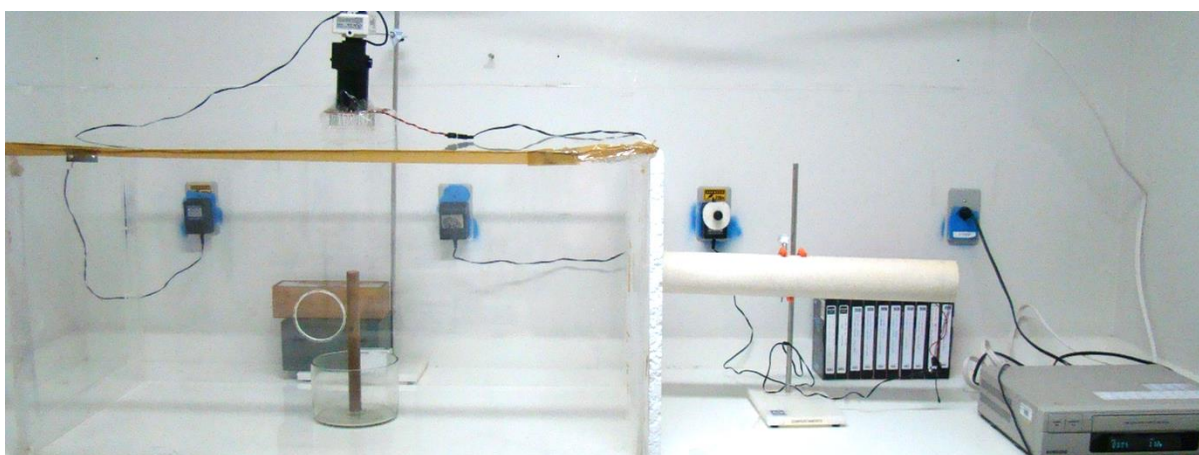


Figura 9 – Gaiola para os ensaios de início de voo - câmera de vídeo (acima da caixa), arena de vidro com haste (no centro da caixa), tubo com ventilador no interior (à direita da caixa) e videocassete do tipo timelapse (à direita da foto, Foto: M^a Raquel Fellet).

Cada ensaio foi realizado utilizando-se grupos de 8-10 insetos do mesmo sexo. Foram desenvolvidas as seguintes séries experimentais, com cinco repetições para *T. cruzi* e cinco para *T. rangeli*:

- T. cruzi*: (1) Machos controle mantidos a 30-25°C
(2) Machos infectados mantidos a 30-25°C
(3) Fêmeas controle mantidos a 30-25°C
(4) Fêmeas infectadas mantidos a 30-25°C

- T. rangeli*: (1) Machos controle mantidos a 25-25°C
(2) Machos infectados mantidos a 25-25°C
(3) Fêmeas controle mantidos a 25-25°C
(4) Fêmeas infectadas mantidos a 25-25°C

O comportamento dos insetos foi registrado através de uma câmera de vídeo (Ikegami, Tokina 10-120 mm, F 1.6, Japão) com iluminação fornecida por LEDs infravermelhos, o que permitiu o registro das imagens mesmo em escuridão funcional. Cabe salientar que os triatomíneos não percebem o comprimento de luz infravermelho utilizado para iluminação dos experimentos (Reisenman & Lazzari 2006). As imagens geradas pela câmera foram armazenadas em fitas VHS mediante um gravador de vídeo cassete de tipo Time Lapse (Samsung SLV-960, Japão). Para cada ensaio a atividade dos insetos na arena circular e haste foi registrada durante 12 horas de escuridão, em seis quadros por segundo (fitas de videocassete com 120 minutos de duração), com o início na primeira hora da escotofase (relógio circadiano). Após a visualização das fitas de videocassete, foram registrados:

- 1) Frequência de início de voo: insetos que alcançam o exterior da arena vs total de insetos no ensaio.
- 2) Sucessos: número de insetos que subiram na haste e iniciaram o voo, atingindo o exterior da arena.
- 3) Fracassos: número de tentativas de voo por insetos que subiram a haste, decolaram e caíram no interior da arena. Esse número corresponde ao total de tentativas falhas, não sendo possível calcular quantos insetos “fracassaram”, pois os mesmos não foram marcados individualmente.

3.11 Análises estatísticas

As comparações estatísticas foram feitas sempre entre os tratamentos (infectado *versus* controle) e no caso de combinações de pares (fêmea controle e macho infectado ou macho controle e fêmea infectada), os mesmos foram comparados também com o grupo controle em todos os ensaios. Para verificar a normalidade dos dados foi realizado o teste *Shapiro-Wilk*. Dados em porcentagens foram transformados em arco-seno antes da realização da análise (Zar 1999). Para todas as análises foram considerados níveis de significância de 95%. Além disso, exceto para as análises de voo, foram feitos testes unicaudais, sendo a hipótese nula considerada verdadeira quando os tratamentos (infectado e controle) foram iguais e a hipótese alternativa, quando a infecção acarretou efeitos negativos ao *fitness*.

Nos experimentos de fecundidade e fertilidade, todas as análises foram feitas mediante o *Software R 3.0.2* (R Core Team 2013) por um colaborador (Dr. David Carrasco). O tempo de pré-oviposição foi analisado utilizando-se o teste de *Wilcoxon* e foram feitas comparações entre os insetos dos tratamentos controle e infectado em cada temperatura e entre as espécies de parasitos. Os dados de valor E e taxa de eclosão dos ovos (variáveis dependentes) foram analisadas para comparar os efeitos: a) da infecção pelo parasito (i.e. insetos controle *vs* infectados) durante três ciclos reprodutivos consecutivos para cada parasito; b) infecção por *T. cruzi* (i.e. controle *vs* infectados) em duas temperaturas experimentais (i.e. 25-25°C *vs* 30-25°C); e c) infecção (i.e. controle *vs* infectados) dos parasitos (i.e. *T. cruzi* e *T. rangeli*) em mesma temperatura de 25-25°C. A variável individual foi definida como um efeito aleatório para explicar as medidas repetidas (mesmos insetos em cada ciclo). Os dados de valor E foram analisados por modelos lineares de efeitos mistos, função *lme()* no pacote “nlme” (Pinheiro et al 2013). Os dados de taxa de eclosão foram analisados por modelos binomiais generalizados de efeitos mistos, mediante a função *glmer()* no pacote “lme4” (Bates et al 2013) utilizando-se de “logit” como uma função de ligação. Os modelos completos com um termo de interação foram ajustados inicialmente e eles foram reduzidos para os modelos de efeitos principais se a interação não foi significativa. Foi verificada para todos os modelos a superdispersão. Contrastes *post-hoc* de interação função *testInteractions()* no pacote “phia” (De Rosario-Martinez 2013) foram realizados para explorar diferenças específicas promovidas por cada tratamento.

Nos ensaios de cópula, a comparação entre o tempo de início da cópula e a duração da cópula dos pares em relação ao controle foi realizada por meio do teste de *Mann Whitney*. As frequências de cópula foram analisadas pelo teste de qui-quadrado, sempre comparando-se

o grupo teste com o grupo controle. Já nos ensaios de cópula com escolha, para analisar se houve diferença na frequência de cópula com um dos dois insetos (controle ou infectado) foi realizado um teste Binomial.

Para os ensaios de qualidade dos ovos (tanto medidas quanto a determinação de proteínas totais) e para o tempo de eclosão das ninfas, as variáveis foram comparadas pelo teste T quando os dados seguiram uma distribuição normal e pelo teste de *Mann Whitney* quando foram não paramétricos. No caso da qualidade de ovos, como se tratou de triplicatas, foram feitas médias antes das análises dos dados. O tempo de sobrevivência das ninfas foi comparado mediante o teste *Log-rank* e foi gerada uma curva de sobrevivência mediante o método de *Kaplan-Meier*.

No experimento de voo, a comparação das frequências de início de voo entre os tratamentos foi feita através do teste qui-quadrado sempre comparando o grupo teste ao grupo controle, tanto quando os sexos foram analisados de forma conjunta, como para cada um dos sexos separadamente. Em relação aos fracassos e sucessos de início de voo, somente foram gerados gráficos explicativos, já que tratava-se de insetos não marcados.

4 RESULTADOS

4.1 A infecção por tripanosomas sobre a fecundidade e fertilidade de *R. prolixus*

4.1.1 Período de pré-oviposição

A figura 10 mostra a duração do período de pré-oviposição dos pares de *R. prolixus* infectados por *T. cruzi* (25-25°C ou 30-25°C) ou por *T. rangeli* (25-25°C) e daqueles expostos aos tratamentos controle correspondentes. As infecções por *T. cruzi* não afetaram o período de pré-oviposição (Figura 10A e B, Teste *Wilcoxon*, $W=178,5$; $p=0,33$ e $W=152,5$; $p=0,30$, respectivamente em 25-25°C e 30-25°C). No entanto, a infecção por *T. rangeli* induziu um atraso de dois dias no período de pré-oviposição dos pares em comparação com aqueles não infectados (Figura 10C, Teste *Wilcoxon*, $W=90,5$; $p<0,01$).

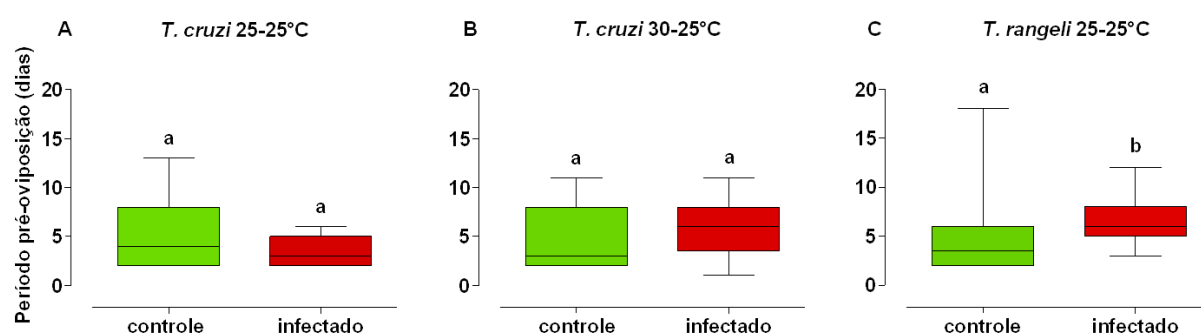


Figura 10 – Período de pré-oviposição de pares de *R. prolixus* infectados por: A) *T. cruzi* 25-25°C; B) *T. cruzi* 30-25°C e C) *T. rangeli* 25-25°C. As medianas, quartis, mínimos e máximos números de dias antes da primeira oviposição estão mostrados em cada *box plot*. A cor verde representa dados obtidos de insetos controle e a vermelha dados de insetos infectados. Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas no período de pré-oviposição das fêmeas, Teste *Wilcoxon*, $p<0,01$.

4.1.2 Valor E e fertilidade de insetos infectados por *T. cruzi* 25-25°C

Nas infecções por *T. cruzi* 25-25°C, para o valor E foi observada uma interação significativa entre infecção e ciclo reprodutivo (Modelo linear de efeitos mistos, $p=0,01$), indicando que o efeito da infecção foi dependente da idade do inseto. Testes *post-hoc* indicaram um aumento significativo no valor E dos insetos infectados durante o segundo ciclo quando comparados ao grupo controle (Figura 11A, controle: $2,57\pm 0,18$; infectado: $3,45\pm 0,18$; $p=0,004$). Adicionalmente, a taxa de eclosão observada para os insetos infectados também aumentou marginalmente em relação à dos insetos controle (Figura 12A, Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, controle: $0,87\pm 0,01$; infectado: $0,90\pm 0,01$; $p=0,03$).

4.1.3 Valor E e fertilidade de insetos infectados por *T. cruzi* 30-25°C

As análises dos valores E dos insetos expostos à infecção por *T. cruzi* 30-25°C apresentaram uma forte interação com o fator ciclo, indicando que a infecção reduziu a fertilidade dos insetos em determinadas fases da vida adulta (Modelo linear de efeitos mistos, $p < 0,001$). Pares infectados produziram ovos menos eficientemente durante o primeiro ciclo reprodutivo em comparação aos controles (Figura 11B, controle: $4,02 \pm 0,21$; infectado: $2,83 \pm 0,29$; $p < 0,001$). Todavia, não foram encontradas diferenças nos valores E dos insetos controle e infectados nos ciclos reprodutivos subsequentes ($p = 0,65$ para ambos os ciclos).

Também para a taxa de eclosão foi observada uma interação entre infecção e ciclo (Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, $p < 0,001$), indicando que a redução da taxa em pares infectados também foi dependente da idade dos insetos. Contrastes *post-hoc* mostraram que a taxa de eclosão dos insetos infectados diminuiu significativamente no terceiro ciclo reprodutivo em comparação à dos insetos do grupo controle (Figura 12B, controle: $0,94 \pm 0,01$; infectado: $0,67 \pm 0,07$; $p < 0,001$).

4.1.4 Valor E e fertilidade de insetos infectados por *T. rangeli* 25-25°C

O valor E dos insetos infectados por *T. rangeli* foi afetado tanto pela infecção (Modelo linear de efeitos mistos, $p = 0,001$) quanto pelo ciclo ($p < 0,001$), mas não houve interação significativa entre ciclo e infecção. A figura 11C mostra que os insetos infectados por *T. rangeli* apresentaram um ligeiro decréscimo nos seus valores E em todos os ciclos comparados aos mostrados pelos insetos do grupo controle. No entanto, essa diferença foi estatisticamente significante durante o segundo (controle: $2,32 \pm 0,24$; infectado: $1,46 \pm 0,30$; $p = 0,04$) e terceiro ciclos (controle: $2,02 \pm 0,19$; infectado: $0,91 \pm 0,14$; $p = 0,02$). Além disso, a interação entre infecção e ciclo reprodutivo foi significativa nas taxas de eclosão (Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, $p < 0,001$). De fato, a infecção parental por *T. rangeli* reduziu significativamente a taxa de eclosão de ovos também durante o segundo (controle: $0,82 \pm 0,05$; infectado: $0,56 \pm 0,08$; $p = 0,006$) e terceiro (controle: $0,70 \pm 0,05$; infectado: $0,45 \pm 0,10$; $p = 0,03$) ciclos (Figura 12C).

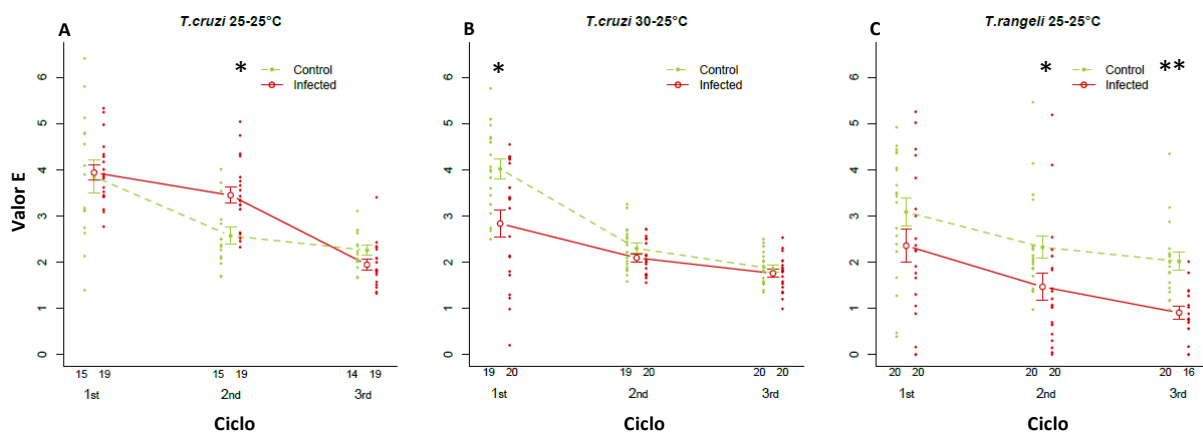


Figura 11 – Valor E de pares de *R. prolixus* infectados por: A) *T. cruzi* 25-25°C; B) *T. cruzi* 30-25°C e C) *T. rangeli* 25-25°C. Os dados representam as médias±e.p. do parâmetro registradas para 15 pares controle e 19 infectados por *T. cruzi* 25-25°C (A), 20 pares controle e 20 infectados por *T. cruzi* 30-25°C (B) e 20 pares controle e 20 infectados por *T. rangeli* 25-25°C (C). A cor verde representa dados obtidos de insetos controle e a vermelha dados de insetos infectados. Os ciclos correspondem períodos de 21 dias entre alimentações e representam o valor E para cada par em um determinado ciclo. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos controle e infectado, Modelo linear de efeitos mistos, * $p < 0,05$.

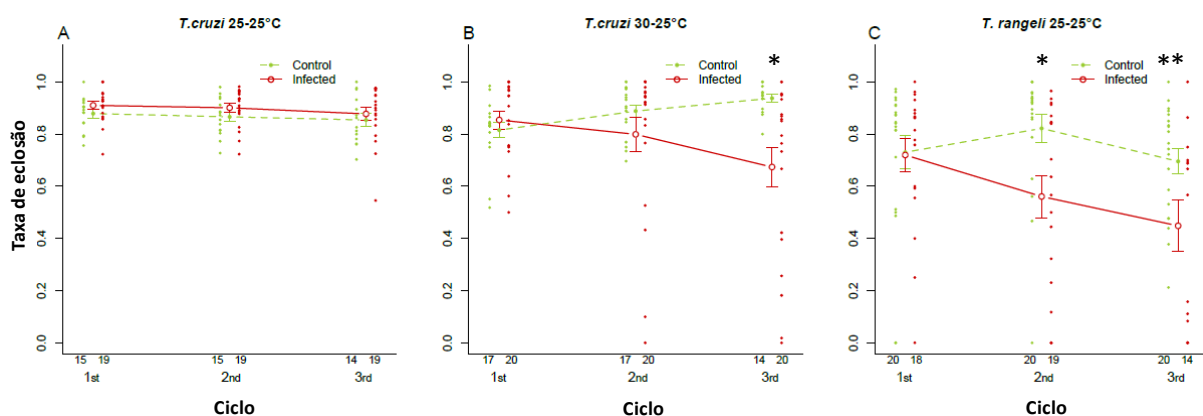


Figura 12 – Taxa de eclosão de ovos de pares de *R. prolixus* infectados por: A) *T. cruzi* 25-25°C; B) *T. cruzi* 30-25°C e C) *T. rangeli* 25-25°C. Os dados representam a porcentagem (média±e.p.) de eclosão dos ovos de 15 pares controle e 19 infectados por *T. cruzi* 25-25°C (A), 17 pares controle e 20 infectados por *T. cruzi* 30-25°C (B) e 20 pares controle e 19 infectados por *T. rangeli* 25-25°C (C). A cor verde representa os dados obtidos com insetos controle e a vermelha os obtidos com insetos infectados. Os ciclos correspondem períodos de 21 dias entre alimentações e representam as taxas de eclosão para cada par em um determinado ciclo. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos controle e infectado, Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, * $p < 0,05$.

4.1.5 O efeito da temperatura sobre a evolução da infecção por *T. cruzi*

Valor E e fertilidade de insetos infectados por T. cruzi 25-25°C vs T. cruzi 30-25°C

A interação estatisticamente significativa entre infecção e temperatura de desenvolvimento (Modelo linear de efeitos mistos, $p=0,007$) indica que *T. cruzi* afetou a eficiência de produção de ovos dependendo da temperatura à qual os insetos foram expostos durante o seu desenvolvimento até a fase adulta. Apesar dos valores E dos insetos controle expostos às duas temperaturas não terem sido diferentes significativamente ($p=0,84$), insetos infectados mantidos a 30-25°C apresentaram uma significativa redução do valor E quando comparados aos insetos mantidos em 25-25°C (Figura 13A, 25-25°C: $3,11\pm 0,14$; 30-25°C: $2,23\pm 0,12$; $p<0,001$).

Resultados similares foram encontrados para as taxas de eclosão de ovos, já que também foi encontrada uma interação significativa entre infecção dos insetos por *T. cruzi* e temperatura (Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, $p=0,02$). O resultado indica que o sucesso de eclosão dos ovos postos por pares infectados variou dependendo das temperaturas a que foram expostos na fase ninfal. A taxa de eclosão de ovos postos por insetos infectados em 30-25°C foi significativamente menor quando comparada à dos insetos mantidos a 25-25°C (Figura 13C, 25-25°C: $0,90\pm 0,01$; 30-25°C: $0,78\pm 0,04$; $p=0,009$). Os insetos controle expostos às mesmas condições não apresentaram tendências semelhantes ($p=0,56$).

4.1.6 Efeito das infecções por diferentes parasitos

Valor E e fertilidade de insetos infectados por T. cruzi 25-25°C vs T. rangeli 25-25°C

Os efeitos das infecções nos insetos mantidos a uma mesma temperatura dependeram da espécie de parasito em questão, como reforçado pelos resultados obtidos com insetos infectados por *T. cruzi* 25-25°C ou *T. rangeli* 25-25°C (Modelo linear de efeitos mistos, $p=0,002$). De fato, a infecção por *T. rangeli* reduziu fortemente o valor E dos insetos quando comparado ao dos insetos infectados por *T. cruzi* (Figura 13B, *T. cruzi*: $3,11\pm 0,14$; *T. rangeli*: $1,62\pm 0,19$; $p<0,001$).

As taxas de eclosão foram claramente influenciadas pela espécie de parasito (Modelo binomial generalizado de efeitos mistos, $p=0,02$), pois houve uma redução significativa na taxa de eclosão dos ovos postos por pares infectados por *T. rangeli* quando comparada com a

taxa de ovos postos pelos insetos infectados por *T. cruzi* (Figura 13D, *T. cruzi*: $0,90\pm 0,01$; *T. rangeli*: $0,59\pm 0,05$; $p < 0,001$).

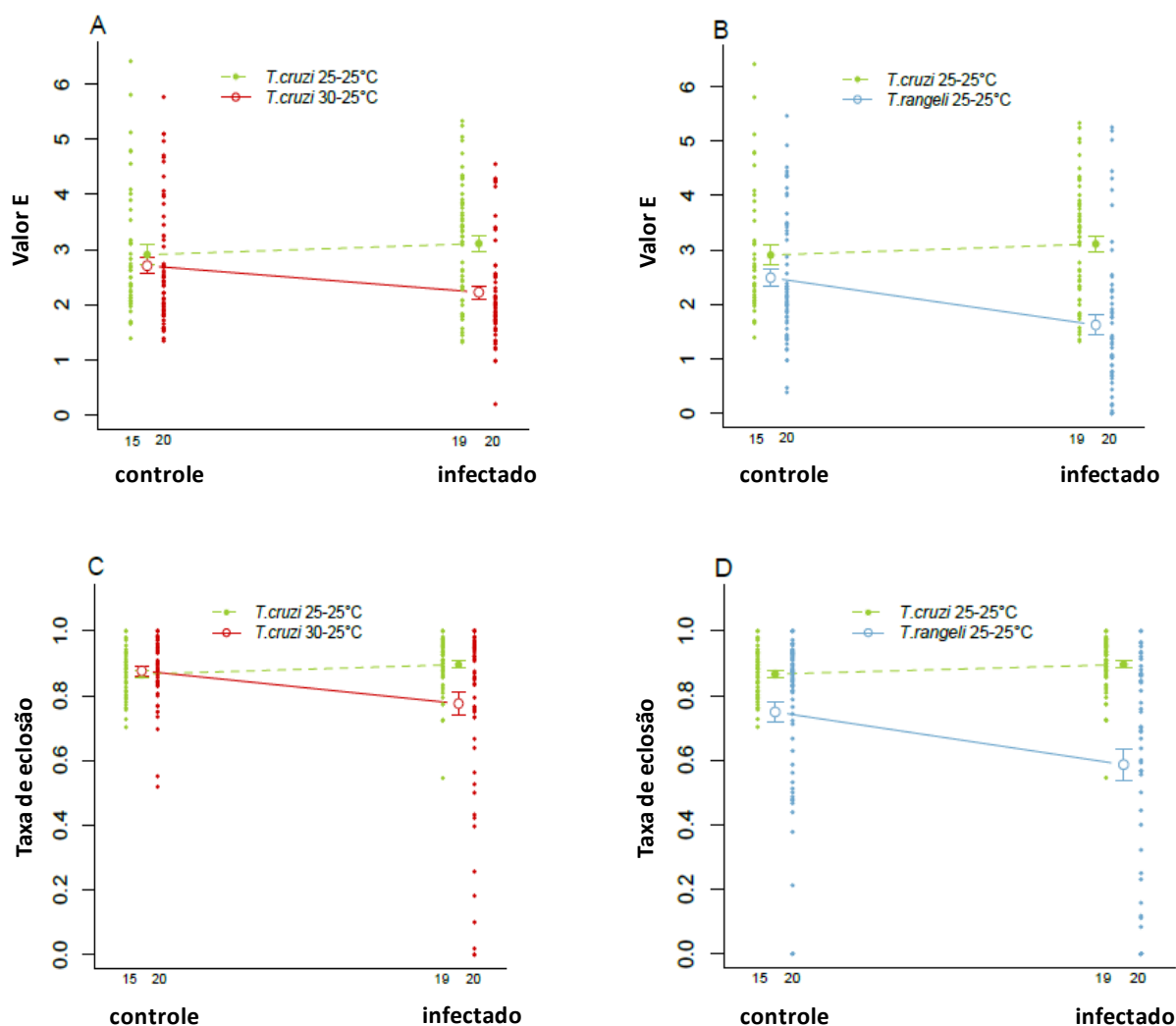


Figura 13 – Comparação dos efeitos das infecções por tripanosomas no valor E (A-B) e na taxa de eclosão dos ovos (C-D) de *R. prolixus*. A) Variação do valor E entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. cruzi* 30-25°C e seus correspondentes controles; B) variação do valor E entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. rangeli* 25-25°C e seus correspondentes controles; C) variação da taxa de eclosão dos ovos entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. cruzi* 30-25°C e seus correspondentes controles; D) variação da taxa de eclosão dos ovos entre os insetos expostos a infecção por *T. cruzi* 25-25°C e *T. rangeli* 25-25°C e seus correspondentes controles. Os dados representam as médias \pm e.p. de 15 pares controle e 19 infectados por *T. cruzi* 25-25°C (A-D), 20 pares controle e 20 infectados por *T. cruzi* 30-25°C (A e C) e 20 pares controle e 20 infectados por *T. rangeli* 25-25°C (B e D). A cor verde representa os dados obtidos com insetos infectados e controle de *T. cruzi* 25-25°C (A-D), a vermelha representa os resultados obtidos com os insetos infectados e controle de *T. cruzi* 30-25°C (A e C) e a azul representa os resultados obtidos com os insetos infectados e controle de *T. rangeli* 25-25°C (B e D). Os pontos representam os valores E e as taxas de eclosão de cada par em cada um dos ciclos.

4.2 A infecção por tripanosomas na qualidade de ovos e ninfas de primeiro estágio de *R. prolixus*

4.2.1 *T. cruzi* 30-25°C

O peso dos ovos postos por pares infectados por *T. cruzi* não diferiu significativamente daquele dos ovos colocados por pares controle. Os pesos médios foram de $0,70\pm 0,03$ mg e $0,74\pm 0,02$ mg, respectivamente (Figura 14A, Teste T, $p>0,05$). No entanto, o comprimento dos ovos postos por pares de insetos infectados foi menor quando comparado ao dos ovos postos por insetos do grupo controle (Figura 14B, controle: 1805 μ m; infectado: 1764 μ m; Teste *Mann Whitney*). A mesma diminuição foi observada para a largura dos ovos postos por pares infectados (Figura 14C, controle: $882,1\pm 4,73$ μ m; infectado: $856,1\pm 5,27$ μ m; Teste T, $p=0,0003$) A quantidade de proteínas totais também foi afetada negativamente pela infecção, sendo que os ovos provenientes de pares infectados apresentaram menor quantidade de proteínas totais do que aqueles provenientes de pares controle (Figura 14D, controle: $95,45\pm 2,47$ μ g; infectado: $81,13\pm 2,22$ μ g, Teste T, $p<0,0001$).

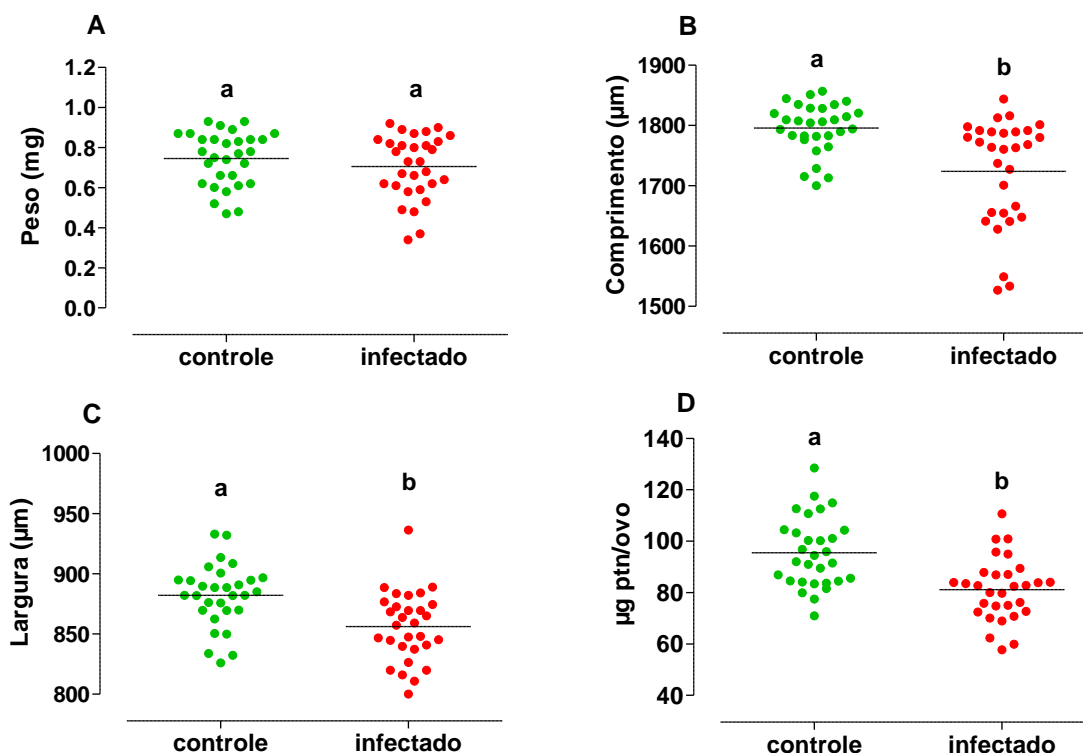


Figura 14 – Comparação da qualidade de ovos postos por pares de *R. prolixus* infectados por *T. cruzi* 30-25°C - A) Peso B) Comprimento C) Largura D) Quantidade de proteínas totais. Cor verde representam ovos provenientes de pares controle e vermelha representam ovos provenientes de pares infectados. Cada ponto representa um ovo. Os traços horizontais representam médias, exceto em B que representam medianas. Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os tratamentos, Teste T em A, C e D e Teste *Mann Whitney* em B, $p<0,05$.

O tempo de eclosão dos ovos, ou seja, o tempo decorrido entre a postura dos ovos e a eclosão das ninfas foi em torno de 15 dias tanto para os ovos provenientes de pares controle quanto para aqueles provenientes de pares infectados por *T. cruzi* (Figura 15A, Teste *Mann Whitney*, $p>0,05$). Da mesma forma, a resistência ao jejum de ninfas de 1º estágio provenientes de pares infectados não diferiu significativamente daquelas provenientes de pares controle (Figura 15B, *Log-rank* - Teste *Mantel-Cox*, $p>0,05$).

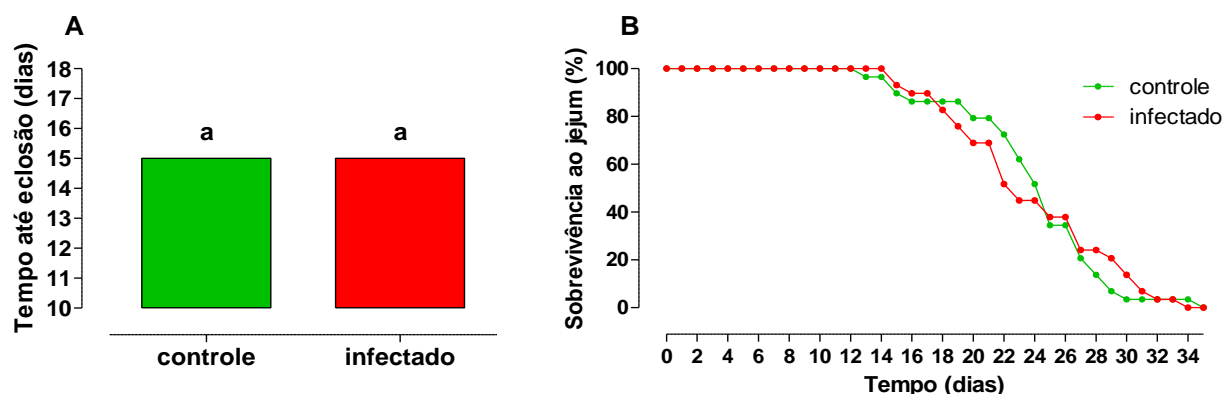


Figura 15 – Comparação da qualidade de ninfas de 1º estágio de *R. prolixus* provenientes de pares infectados por *T. cruzi* 30-25°C - A) Tempo até a eclosão. B) Resistência ao jejum. Cor verde representam as ninfas provenientes de pares controle e vermelha representam ninfas provenientes de pares infectados. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos, Teste *Mann Whitney* em A e *Log-rank* – Teste *Mantel-Cox* em B, $p>0,05$.

4.2.2 *T. rangeli* 25-25°C

Os ovos postos por pares infectados por *T. rangeli* tiveram menor peso do que aqueles provenientes de pares controle (Figura 16A, controle: $0,65\pm0,03$ mg; infectado: $0,56\pm0,03$ mg; Teste T, $p=0,03$). O comprimento dos ovos dos pares infectados e controle foi semelhante (Figura 16B, controle: $1758\pm7,14$ μm ; infectado: $1759\pm9,80$ μm ; Teste T, $p>0,05$). Entretanto, a largura dos ovos provenientes de pares infectados foi menor do que a dos ovos provenientes de pares controle (Figura 16C, controle: $867,1$ μm ; infectado: $831,5$ μm Teste *Mann Whitney*, $p=0,005$). A quantidade de proteínas totais registrada para os ovos de pares infectados também foi menor do que a dos ovos de pares controle (Figura 16D, Teste *Mann Whitney*, $p=0,008$; controle: $89,89$ μg ; infectado: $79,74$ μg).

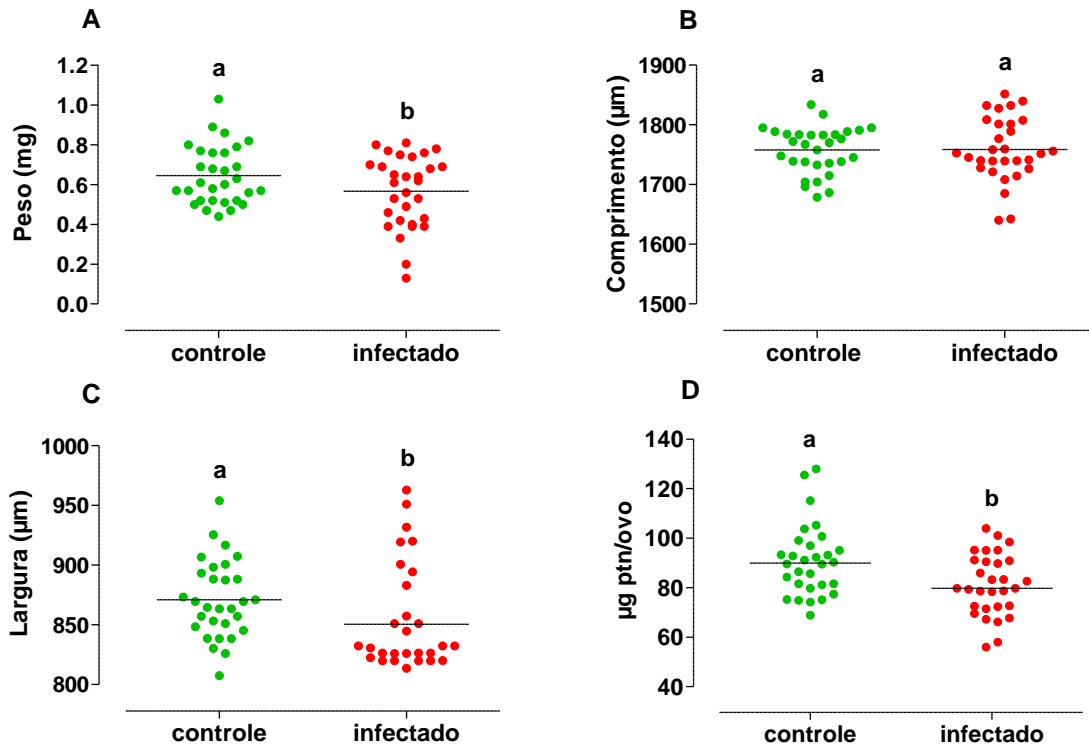


Figura 16 – Comparação da qualidade de ovos de pares de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* 25-25°C - A) Peso B) Comprimento C) Largura D) Quantidade de proteínas totais. Cor verde representam ovos provenientes de pares controle e vermelha representam ovos provenientes de pares infectados. Cada ponto representa um ovo. Os traços horizontais representam: A e B médias e em C e D medianas. Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os tratamentos, Teste T em A e B e Teste *Mann Whitney* em C e D, $p < 0,05$.

Da mesma forma que o observado nos ensaios com *T. cruzi*, nem o tempo de eclosão nem a resistência ao jejum das ninfas de 1º estágio provenientes de ovos postos por adultos infectados diferiram daquelas dos ovos e ninfas provenientes de adultos controle (Figura 17A e B, Teste *Mann Whitney*, $p > 0,05$ e Log-rank - Teste *Mantel-Cox*, $p > 0,05$, respectivamente).

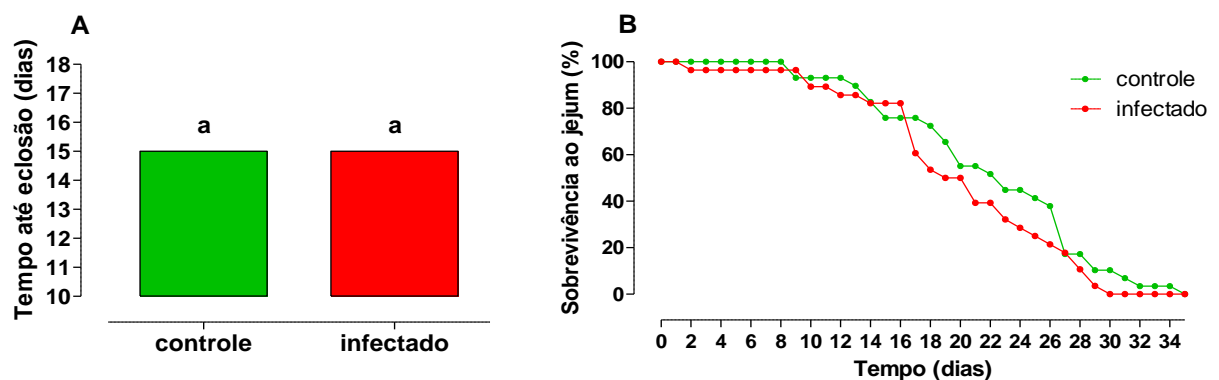


Figura 17 – Comparação da qualidade de ninfas de 1º estágio de *R. prolixus* provenientes de pares infectados por *T. rangeli* 25-25°C - A) Tempo até a eclosão. B) Resistência ao jejum. Cor verde representam as ninfas provenientes de pares controle e vermelha representam ninfas provenientes de pares infectados. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos, Teste *Mann Whitney* em A e Log-rank – Teste *Mantel-Cox* em B, $p > 0,05$.

4.3 A infecção por tripanosomas e o comportamento de cópula de *R. prolixus*

4.3.1 *T. cruzi* 25-25°C

Frequência de cópula

A infecção por *T. cruzi* 25-25°C não afetou significativamente a frequência de cópula de pares (Figura 18, para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc): Chi-quadrado, $p > 0,05$), apesar de que uma pequena redução na frequência de cópula foi observada (20% não copularam) com os pares com machos e fêmeas infectados (mifi) e com machos infectados (mifc). No tratamento (mcfi), 100% dos pares copularam.

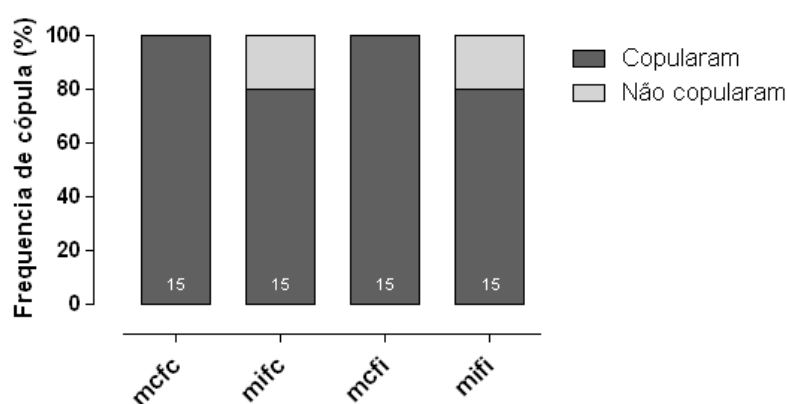


Figura 18 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 25-25°C sobre a frequência de cópula (%) de pares de *R. prolixus* - Barras cinzas escuras indicam os pares que copularam e barras cinzas claras indicam pares que não copularam. Pares: mcfc, macho controle e fêmea controle; mifi, macho infectado e fêmea infectada; mifc, macho infectado e fêmea controle e mcfi, macho controle e fêmea infectada. Os números nas barras indicam o número de pares em cada tratamento. Para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc), Chi-quadrado, $p > 0,05$.

Latência para o início e duração da cópula

A infecção por *T. cruzi* não promoveu diferenças significativas na latência para o início da cópula dos insetos (mifc, mcfi e mifi) quando comparada à obtida com insetos controle (mcfc), Em todos os tratamentos, os pares demoraram entre 2,55 e 4,87 min (mediana) para iniciarem a cópula (Tabela 1, para todas as análises em relação ao grupo controle (mcfc): Teste *Mann Whitney*, $p > 0,05$).

A duração da cópula, que compreende o período em que macho e fêmea mantêm as genitálias unidas, variou entre 36 e 48 minutos entre os grupos. Entretanto, essa variação

também não foi significativamente diferente em nenhum dos tratamentos (Tabela 1, para todas as análises em relação ao grupo controle (mcfc): Teste *Mann Whitney*, $p>0,05$).

Tabela 1 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 25-25°C sobre a latência para o início da cópula e a sua duração em pares de *R. prolixus*.

Par	Latência para início	Duração da cópula	n
	min (mediana)	min (mediana)	
mcfc	4,87	45,58	15
mifc	2,55	42,05	12
mcfi	3,27	36,75	15
mifi	4,35	48,17	12

mcfc: macho controle e fêmea controle; mifi: macho infectado e fêmea infectada
 mifc: macho infectado e fêmea controle; mcfi: macho controle e fêmea infectada
 Para todas as análises em relação o controle mcfc, Teste *Mann Whitney*, $p>0,05$

4.3.2 *T. cruzi* 30-25°C

Frequência de cópula

Entre 10 e 20% dos pares nos quais um dos insetos ou ambos estavam infectados pelo *T. cruzi* não iniciaram a cópula durante o período de avaliação (Figura 19). Entretanto, os valores não diferiram significativamente daqueles apresentados pelos pares controle onde foi observada uma frequência de cópula de 100% (Figura 19, para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc): Chi-quadrado, $p>0,05$).

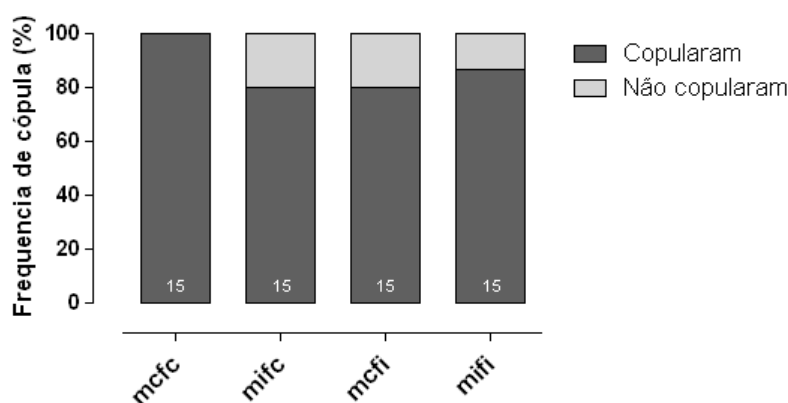


Figura 19 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a frequência de cópula (%) de pares de *R. prolixus* - Barras cinzas escuras indicam os pares que copularam e barras cinzas claras indicam pares que não copularam. Pares: mcfc, macho controle e fêmea controle; mifi, macho infectado e fêmea infectada; mifc, macho infectado e fêmea controle e mcfi, macho controle e fêmea infectada. Os números nas barras indicam o número de pares. Para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc), Chi-quadrado, $p>0,05$.

Latência para o início e duração da cópula

Da mesma forma que foi observado para os insetos infectados com *T. cruzi* 25-25°C, nem a latência para o início de cópula nem a duração da mesma foram alterados nos insetos do grupo *T. cruzi* 30-25°C (Tabela 2, para todas as análises em comparação ao grupo controle (mcfc): Teste *Mann Whitney*, $p > 0,05$). Os pares demoraram cerca de 3 min para iniciarem a cópula, que teve uma duração de aproximadamente 45 min (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a latência para o início da cópula e a sua duração em pares de *R. prolixus*.

Par	Latência para início	Tempo de cópula	n
	min (mediana)	min (mediana)	
mcfc	3,32	45,18	15
mifc	2,25	41,08	12
mcfi	3,29	41,17	12
mifi	3,32	47,70	13

mcfc: macho controle e fêmea controle; mifi: macho infectado e fêmea infectada
mifc: macho infectado e fêmea controle; mcfi: macho controle e fêmea infectada
Para todas as análises em relação ao controle mcfc, Teste *Mann Whitney*, $p > 0,05$

4.3.3 *T. rangeli* 25-25°C

Frequência de cópula

Diferentemente do observado para os grupos infectados com *T. cruzi*, a frequência de cópula de pares infectados por *T. rangeli*, diminuiu. Entretanto, o único tratamento que diferiu significativamente do controle foi aquele onde os insetos de ambos os sexos foram infectados (mifi) (Figura 20, Chi-quadrado, $p = 0,01$). Enquanto 94,11% dos pares mcfc copularam, somente 58,82% dos pares mifi realizaram a cópula. Dos pares mifi que não copularam, dois padrões foram observados: 1) os indivíduos ficavam em posição de pré-cópula, i.e, macho posicionado lateralmente a fêmea, segurando a mesma com suas pernas e a fêmea permanecia imóvel, sem tocarem a genitália do outro 2) macho e fêmea não se aproximavam. Para os tratamentos mifi e mcfi foram observadas frequências de cópula de 82,35% (Figura 20, Chi-quadrado, $p > 0,05$).

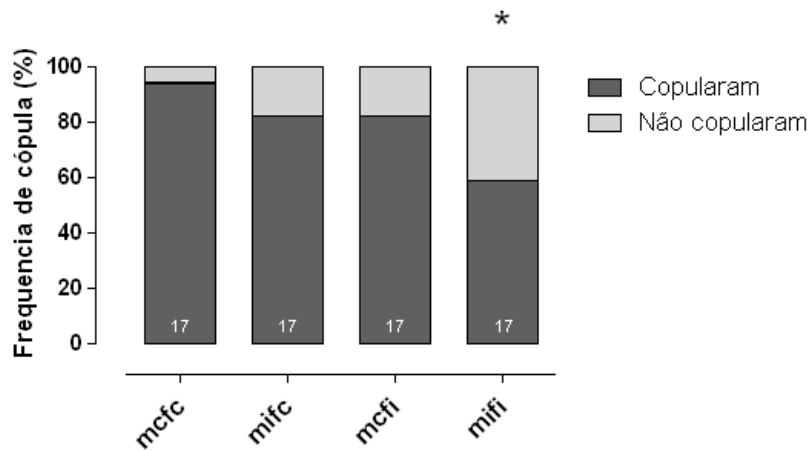


Figura 20 - Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a frequência de cópula (%) de pares de *R. prolixus* - Barras cinzas escuras indicam os pares que copularam e barras cinzas claras indicam pares que não copularam. Pares: mcfc, macho controle e fêmea controle; mifi, macho infectado e fêmea infectada; mifc, macho infectado e fêmea controle e mcfi, macho controle e fêmea infectada. Os números nas barras indicam o número de pares. Os asteriscos representam diferenças significativas entre o tratamento e o grupo controle (mcfc), Chi-quadrado, * $p < 0,05$.

Latência para o início e duração da cópula

A latência para iniciar a cópula dos pares infectados por *T. rangeli* foi prolongado aproximadamente 4 minutos em relação ao do grupo controle (Tabela 3, Teste *Mann Whitney*, $p = 0,007$). Nas outras combinações (mifc e mcfi), não foram observadas diferenças significativas quando os dados foram comparados aos dos insetos controle (Tabela 3, Teste *Mann Whitney*, $p > 0,05$).

A infecção também afetou a duração da cópula dos pares mifi e dos pares mifc. A duração da cópula foi reduzida em aproximadamente 7 minutos nesses grupos em relação à observada para insetos do grupo mcfc (Tabela 3, mifi – Teste *Mann Whitney*, $p = 0,002$, mifc – Teste *Mann Whitney*, $p = 0,02$). Entretanto, nos pares em que somente as fêmeas foram infectadas (mcfi) a duração da cópula não apresentou diferenças significativas em comparação a do grupo controle (Tabela 3, Teste *Mann Whitney*, $p > 0,05$).

Tabela 3 – Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a latência para o início da cópula e a sua duração em pares de *R. prolixus*.

Par	Latência para início	Tempo de cópula	N
	min (mediana)	min (mediana)	
mcfc	1,87	45,17	16
mifc	2,54	38,80 *	14
mcfi	1,81	43,23	14
mifi	5,75 *	38,01 *	10

mcfc: macho controle e fêmea controle; mifi: macho infectado e fêmea infectada

mifc: macho infectado e fêmea controle; mcfi: macho controle e fêmea infectada

* indica diferença significativa em relação ao grupo controle mcfc, Teste *Mann Whitney*, $p < 0,05$.

4.4 A infecção por tripanosomas na escolha do parceiro para a cópula

4.4.1 *T. cruzi* 30-25°C

A infecção por *T. cruzi* 30-25°C não afetou significativamente a frequência de cópula no experimento anterior (quando cada inseto era colocado com um indivíduo do sexo oposto sem opção de escolha). No entanto, quando um inseto não infectado (tanto fêmeas quanto machos) foi colocado com dois indivíduos do sexo oposto, um controle e um infectado, os resultados mostraram um efeito da infecção, já que houve uma frequência significativamente maior de cópula com indivíduos controle (Figura 21, Teste binomial, $p < 0,05$). Como pode se observar na figura 21A, 80% dos machos copularam com fêmeas controle (Teste binomial, $p < 0,05$). Um padrão semelhante foi observado quando fêmeas tiveram a opção de escolher, já que 80% delas copularam com machos controle (Figura 21B, Teste binomial, $p < 0,05$).

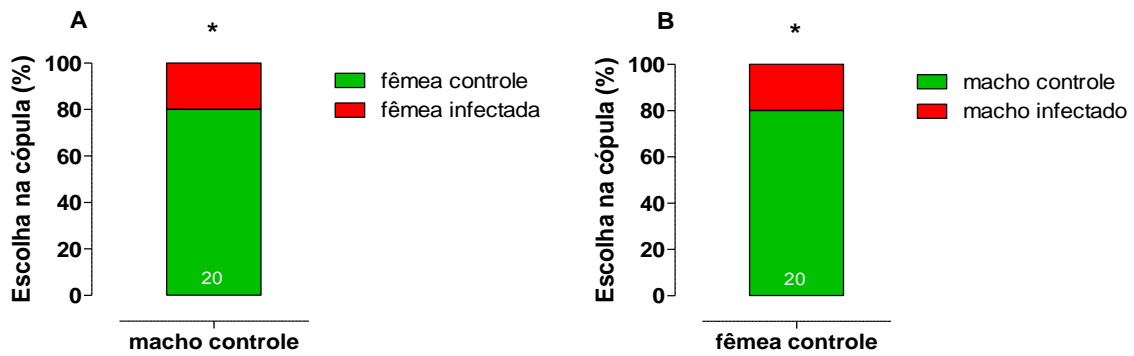


Figura 21 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a frequência de escolha (%) de parceiro sexual: A) machos – um macho não infectado escolhe entre: uma fêmea controle ou uma fêmea infectada por *T. cruzi*. B) fêmeas – uma fêmea não infectada escolhe entre: um macho controle ou um macho infectado por *T. cruzi*. Os números nas barras indicam o número de grupos testados. Barras verdes indicam a frequência de escolha de insetos controle e as vermelhas a de insetos infectados (Para ambas as análises, Teste binomial, * $p < 0,05$).

4.4.2 *T. rangeli* 25-25°C

Para os insetos infectados com *T. rangeli*, a infecção havia alterado a frequência de cópula de pares na ausência de opção de escolha de parceiro (ensaio anterior). Neste experimento, onde adultos não infectados podiam escolher o parceiro para a cópula, a influência da infecção pelo *T. rangeli* foi ainda mais evidente. A figura 22 mostra que tanto os machos (22A) quanto as fêmeas (22B) mostraram uma frequência de cópula significativamente maior com parceiros controle (Figura 22 A e B, Teste binomial, $p < 0,05$ em ambos os casos). Particularmente, 80% dos machos escolheram fêmeas controle, enquanto 90% das fêmeas escolheram machos controle.

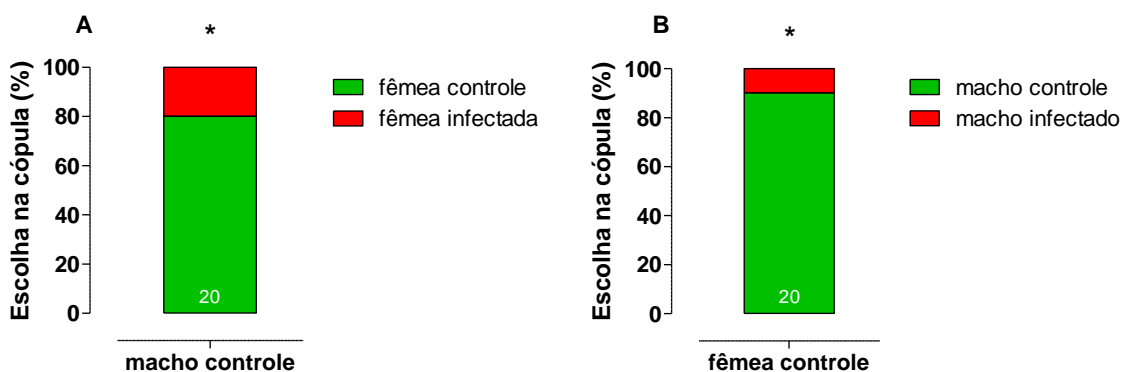


Figura 22 – Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a frequência de escolha (%) de parceiro sexual: A) machos – um macho não infectado escolhe entre: uma fêmea controle ou uma fêmea infectada por *T. rangeli*. B) fêmeas – uma fêmea não infectada escolhe entre: um macho controle ou um macho infectado por *T. rangeli*. Os números nas barras indicam o número de grupos testados. Barras verdes indicam a frequência de escolha de insetos controle e as vermelhas a de insetos infectados (Para ambas as análises, Teste binomial, * $p < 0,05$).

4.5 A infecção por tripanosomas sobre a frequência do início do voo em *R. prolixus*

4.5.1 *T. cruzi* 30-25°C

Em geral, a frequência de início de voo dos adultos, considerando os dados de fêmeas e machos em conjunto, foi afetada pela infecção por *T. cruzi* 30-25°C. A frequência foi menor para os insetos infectados (22,68%) em comparação à dos insetos do grupo controle (39%) (Figura 23A, Chi-quadrado, $p=0,02$).

A frequência de início de voo nas fêmeas também foi afetada pela infecção por *T. cruzi* em 30-25°C. Fêmeas infectadas voaram significativamente menos (12%) do que as fêmeas do grupo controle (32%) (Figura 23B, Chi-quadrado, $p=0,01$). Apesar de ser notada uma pequena queda na frequência de início de voo dos machos infectados (40%) em relação aos dos machos controle (46%), essa diferença não foi significativa (Figura 23B, Chi-quadrado, $p>0,05$).

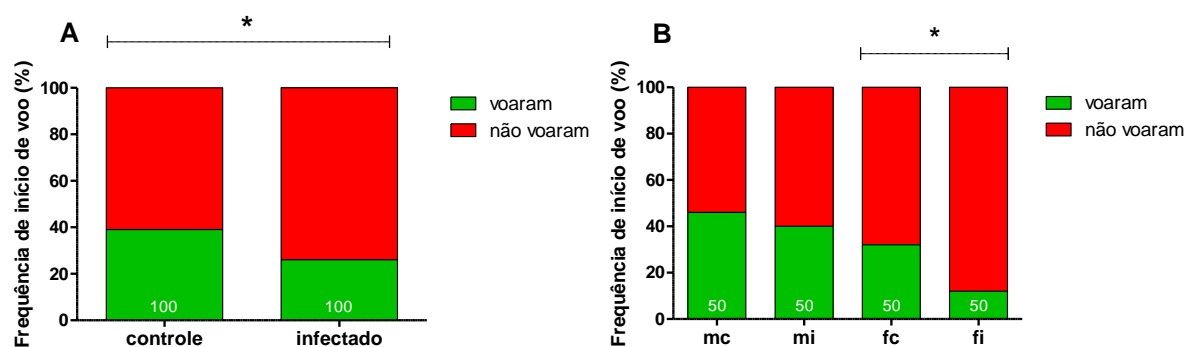


Figura 23 – Efeito da infecção por *T. cruzi* 30-25°C sobre a frequência de voo (%) de *R. prolixus*: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam a porcentagem de insetos que saíram da arena circular mediante o voo e as vermelhas representam a dos insetos que não saíram da arena. Os números nas barras indicam o número total de insetos em cada tratamento. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Chi-quadrado, $*p<0,05$.

Além da frequência de início de voo ter sido afetada pela infecção por *T. cruzi*, a razão entre fracasso (tentativas de voo cujos insetos caem novamente no interior da arena) e sucesso (voos que alcançam o exterior da arena) foi 3,36 vezes maior para os insetos infectados em comparação aos insetos controle (Figura 24A). A figura 24B mostra que, tanto para os machos quanto para as fêmeas, as razões também foram maiores com a infecção. A razão entre fracassos e sucessos foi 2,26 vezes maior para os machos infectados em comparação

com os do grupo controle, enquanto nas fêmeas infectadas essa razão foi ainda maior, 8,15 vezes em comparação às fêmeas controle.

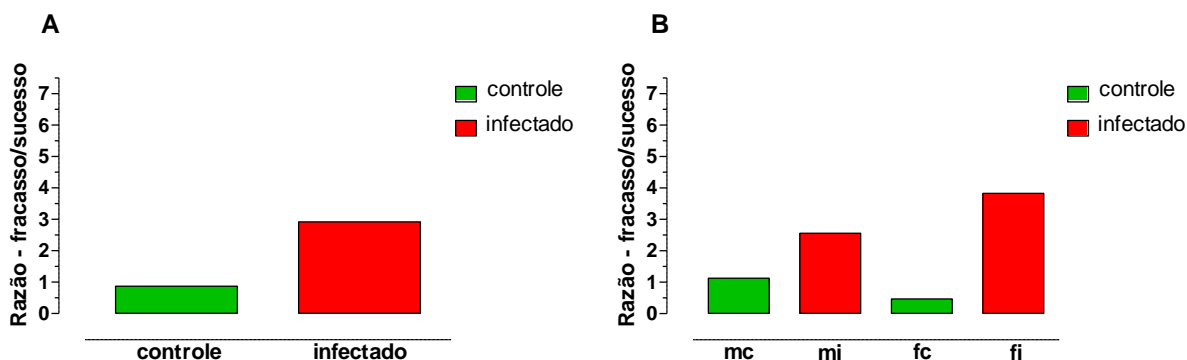


Figura – 24 – Razão de fracasso/sucesso de *R. prolixus* infectados por *T. cruzi* 30-25°C: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam os dados de insetos controle e as vermelhas representam os de insetos infectados.

4.5.2 *T. rangeli* 25-25°C

De maneira semelhante ao observado após infecção por *T. cruzi*, a infecção por *T. rangeli* também reduziu a frequência de início de voo de *R. prolixus*, sendo de 25,55% para os insetos infectados em comparação a 43,75% dos insetos controle (Figura 25A, Chi-quadrado, $p=0,005$).

No entanto, diferentemente do observado para insetos infectados por *T. cruzi*, a infecção por *T. rangeli* (Figura 25B) além de afetar marginalmente a frequência de início de voo de fêmeas (Chi-quadrado, $p=0,04$), também afetou a frequência de início de voo nos machos (Chi-quadrado, $p=0,02$). Enquanto 35% das fêmeas controle iniciaram o voo, apenas 20% das fêmeas infectadas voaram. Nos machos, a frequência de início de voo foi de 52% para os insetos do grupo controle e somente 32% para os machos infectados.

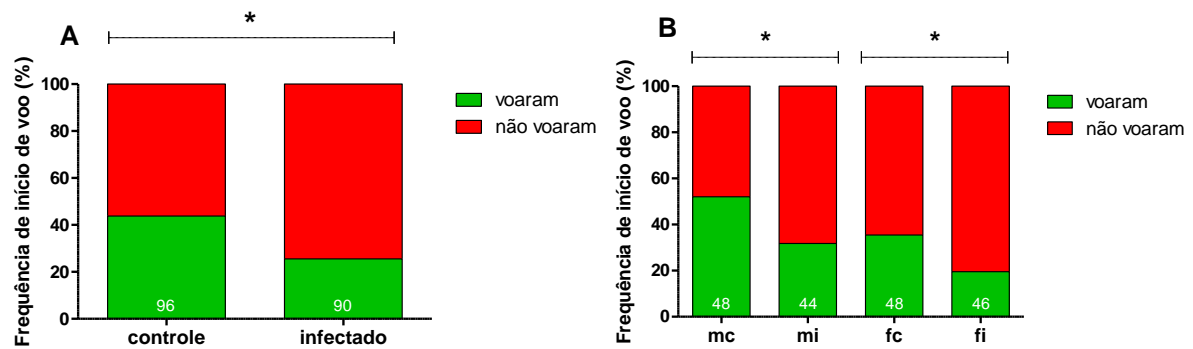


Figura 25 – Efeito da infecção por *T. rangeli* 25-25°C sobre a frequência de voo (%) de *R. prolixus*: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam a porcentagem de insetos que saíram da arena circular mediante o voo e as vermelhas representam a dos insetos que não saíram da arena. Os números nas barras indicam o número total de insetos em cada tratamento. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Chi-quadrado, *p<0,05.

A figura 26A demonstra que a razão entre fracasso e sucesso do início de voo foi ainda mais evidente nos insetos infectados por *T. rangeli* (7,95 vezes maior em comparação à de insetos controle). Os machos infectados apresentaram 7,35 vezes mais fracassos do que os machos do grupo controle, enquanto as fêmeas infectadas apresentaram 8,8 vezes mais fracassos que as controle (Figura 26B).

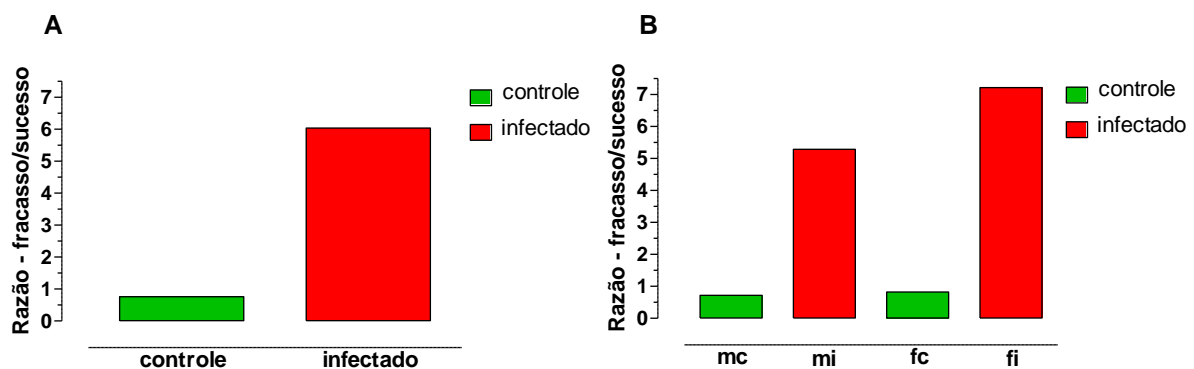


Figura - 26 – Razão de fracasso/sucesso de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* 25-25°C: A) adultos (machos e fêmeas somados) B) machos e fêmeas (separadamente) - mc: machos controle; mi machos infectados; fc: fêmeas controle; fi: fêmeas infectadas. Barras verdes representam os dados de insetos controle e as vermelhas representam os de insetos infectados.

5 DISCUSSÃO

Os parasitos podem induzir uma série de alterações comportamentais e fisiológicas sobre os seus hospedeiros (Hurd 2003; Matthews 2011). Diversos estudos mostraram efeitos negativos de microrganismos em vários modelos de insetos vetores: *Plasmodium* spp. vs mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Aedes* (Ferguson & Read 2002; Araujo et al 2011), Dengue vírus vs mosquitos *Aedes* (Grimstad et al 1980; Lima-Camara et al 2011), *Leishmania* spp. vs flebotomíneos (Schlein et al 1992; Rogers & Bates 2007) e *Trypanosoma* spp. vs triatomíneos (Grewal 1957; Botto-Mahan et al 2006). A maioria desses autores tem avaliado parâmetros tais como capacidade de alimentação sanguínea, duração do desenvolvimento, longevidade de adultos, desempenho no acasalamento, fecundidade e fertilidade com o propósito de medir o impacto da infecção por patógenos. No caso dos triatomíneos, enquanto *T. rangeli* foi apontado como um agente patogênico (Grewal 1957; Añez 1984; Eichler & Schaub 2002), *T. cruzi* tem sido considerado fundamentalmente não patogênico para esses insetos (Zeledón et al 1970; Schaub 1988a,b; Eichler & Schaub 2002). Adicionalmente, os estudos com *T. rangeli* infectando insetos do complexo *R. prolixus* somente avaliaram aspectos de morfologia, desenvolvimento e sobrevivência, sem determinar potenciais consequências da infecção sobre a reprodução desses insetos.

A fecundidade e a fertilidade de vetores infectados por patógenos são parâmetros relevantes a serem investigados, pois refletem o valor reprodutivo dos insetos. Existem evidências que mostram que esses parâmetros podem ser afetados quando triatomíneos e mosquitos estão infectados por patógenos (Lima et al 1992; Sylvestre et al 2013). Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar se a infecção por tripanosomas afeta o tempo necessário para a primeira postura das fêmeas, a fecundidade e fertilidade de adultos de *R. prolixus*. Inicialmente, os efeitos das infecções de cada um dos parasitos foram estudados em 25°C, temperatura habitualmente escolhida por insetos dessa espécie (Schilman & Lazzari 2004). Adicionalmente, no caso de *T. cruzi*, foi proposto avaliar a potencial relação da carga parasitária dos insetos com os efeitos da infecção sobre a reprodução. Assim, um experimento também foi realizado com insetos criados a 30°C, já que sabe-se que nessa temperatura a parasitemia por *T. cruzi* é significativamente maior (Rodrigues 2013). Os resultados obtidos mostraram que as infecções por esses protozoários podem acarretar custos reprodutivos para adultos de *R. prolixus*, consequências que provavelmente irão afetar o *fitness* desses insetos. Na infecção por *T. cruzi*, os efeitos

negativos parecem ser o resultado de uma interação inicial entre a infecção e a temperatura ambiental que gerou como consequência uma variação da carga parasitária dos insetos na sua chegada na fase adulta. Em decorrência disso, o desempenho reprodutivo foi o resultado final de uma interação entre a carga parasitária e a idade dos insetos adultos. Na infecção por *T. rangeli* foi evidenciado que os efeitos negativos são também dependentes da idade dos insetos adultos.

O primeiro aspecto avaliado na presente tese foi o potencial impacto da infecção por tripanosomas sobre o tempo necessário para a primeira postura das fêmeas de *R. prolixus*. Os resultados demonstraram que independentemente da temperatura de criação dos insetos, a infecção por *T. cruzi* não afeta esse parâmetro. Oliveira et al (2010) reportaram resultados semelhantes em *T. brasiliensis* infectados por *T. cruzi*. A infecção por *T. rangeli*, no entanto, gerou um atraso no início de oviposição de fêmeas, sugerindo um custo em termos da duração da sua vida reprodutiva.

Um resultado inesperado foi o aumento observado na taxa de conversão de sangue ingerido em ovos (valor E) diante da infecção por *T. cruzi* em insetos criados a 25°C. Cabe salientar que esse efeito foi limitado, sendo significativo somente durante o segundo ciclo reprodutivo avaliado. Além disso, a taxa de eclosão dos ovos postos pelos mesmos insetos foi significativamente maior do que a de ovos postos por insetos controle. Entretanto, a mesma não foi afetada pela idade dos insetos adultos. No momento, apenas podemos especular sobre as causas desse fenômeno, que apresenta um perfil de reação semelhante à hormese, descrita para insetos expostos a doses subletais de pesticidas (ver revisão Guedes & Cutler 2013). Brevemente, este fenômeno é caracterizado por uma reversão da resposta diante de um fator gerador de estresse observado entre baixas e altas doses do mesmo. Esse é um tópico interessante para ser futuramente investigado, especialmente dada a possibilidade dos efeitos da infecção serem dependentes do ambiente, podendo ainda se tornar levemente benéficos em determinadas situações.

Os efeitos negativos observados para os insetos infectados com *T. cruzi* e criados a 30°C possivelmente foram decorrentes de uma maior carga parasitária. De fato, os insetos expostos a esse tratamento apresentaram diminuições significativas nas suas taxas de conversão de sangue em ovos e de eclosão dos mesmos. O fato de que a diminuição dessas variáveis foi observada apenas no primeiro ciclo reprodutivo sugere que os efeitos negativos foram promovidos por uma maior população de parasitos na temperatura de criação mais alta. Assim, o crescimento do número de parasitos pode ter afetado a disponibilidade de nutrientes para a reprodução dos insetos. Após a muda imaginal, os insetos foram transferidos para 25°C

a fim de se evitar a promoção de uma redução dos recursos nutricionais devida a um aumento da taxa metabólica em altas temperaturas. Nos ciclos seguintes, a combinação de uma menor temperatura ambiente (com a consequente diminuição da taxa de crescimento dos parasitos) e da exposição dos insetos ao jejum entre ciclos (com a consequente diminuição dos nutrientes disponíveis) podem ter promovido uma diminuição na quantidade de parasitos. Rodrigues (2013), ao estudar *R. prolixus* infectado com a cepa CL após 15 dias de infecção, encontrou uma maior quantificação de *T. cruzi* no intestino médio posterior, em temperaturas mais altas (27 e 30°C) em relação às mais baixas (21 e 24°C) tanto através de câmara de Neubauer quanto por qPCR. Assim, é possível sugerir que nos ciclos subsequentes a capacidade reprodutiva dos insetos não foi afetada devido a uma queda na população de *T. cruzi* presente no seu intestino posterior. No entanto, apesar de que durante os dois últimos ciclos ovarianos estudados os insetos infectados mantiveram parâmetros de fecundidade semelhantes aos dos não infectados, a qualidade dos ovos produzidos pelos últimos, i.e. sua taxa de eclosão, foi diminuída. Adicionalmente, esse parâmetro reprodutivo foi afetado pela idade dos insetos, já que a proporção de embriões viáveis diminuiu a medida que os adultos se tornaram mais velhos.

Nossos resultados parecem indicar que a infecção por *T. cruzi* traz efeitos negativos para seus hospedeiros invertebrados dependendo, em parte, das condições ambientais. Efeitos potenciais da infecção por este parasito no *fitness* de triatomíneos foram previamente estudados em *P. megistus* e *T. brasiliensis*, ambos criados em altas temperaturas (Lima et al 1992; Oliveira et al 2010). No primeiro estudo, fêmeas de *P. megistus* infectadas com *T. cruzi* e mantidas a 30°C mostraram uma redução significativa da sua fecundidade (Lima et al 1992). Interessantemente, um resultado semelhante não foi observado com fêmeas infectadas de *T. brasiliensis* (Oliveira et al 2010) criadas a 29°C. Estas diferenças marcantes poderiam ser o resultado da interação entre insetos, parasitos e temperatura, como observado no nosso estudo. Rodrigues (2013) demonstrou que populações de epimastigotas de cultura de *T. cruzi* mantidas a 30°C duplicam em número em relação àquelas mantidas em 27°C, determinando que o crescimento dos parasitos em cultura é diretamente relacionado com a temperatura. Baseado nisso, em situações sem restrições nutricionais os parasitos poderiam alcançar populações massivas nos triatomíneos. Assim, os insetos perderiam uma expressiva proporção das suas reservas nutricionais devido ao crescimento dos parasitos e às respostas imunológicas desencadeadas (Dettloff et al 2001; Cheon et al 2008). As altas parasitemias associadas à temperaturas elevadas podem ter sido mais críticas para *P. megistus*, cujos indivíduos preferem temperaturas mais baixas (Pires et al. 2002). Este não seria o caso de

T. brasiliensis que prefere temperaturas relativamente altas (ca. 30°C, Guarneri et al 2003) características dos abrigos onde esses insetos buscam proteção durante o dia na caatinga do Nordeste do Brasil (Lorenzo et al 2000).

Uma vez que *T. rangeli* pode atravessar o epitélio intestinal e continuar seu desenvolvimento na hemocele e nas glândulas salivares, a infecção por esse parasito pode resultar em populações massivas de parasitos, tanto no intestino, quanto na hemolinfa do vetor (D' Alessandro 1976). Isso pode promover uma relevante exploração dos recursos nutricionais do hospedeiro invertebrado e certamente impactar a sua fecundidade e fertilidade. De fato, os efeitos da infecção por *T. rangeli* foram mais evidentes, uma vez que além do atraso no intervalo pré-oviposição mencionado, as fêmeas infectadas por esse parasito tiveram uma baixa fecundidade (queda do seu valor E) e fertilidade. Adicionalmente, e de maneira semelhante ao observado após infecção por *T. cruzi*, estes efeitos aumentaram com a idade dos insetos. A patogenicidade de *T. rangeli* para triatomíneos parece variar de acordo com a cepa do parasito e as metodologias experimentais utilizadas (Vallejo et al 1986; Rodrigues 2013). Contudo, efeitos negativos da infecção por *T. rangeli* na performance reprodutiva de triatomíneos não tinham sido estudados até o presente momento. Nesse sentido, nossos resultados demonstraram um efeito negativo de *T. rangeli*, desconhecido até o presente, que afeta parâmetros críticos para o sucesso reprodutivo do seu inseto vetor.

Os embriões dos insetos necessitam de uma rica reserva energética durante seu desenvolvimento que é estocada dentro do ovo, mais precisamente no vitelo. Os nutrientes do vitelo devem suprir todas as necessidades do embrião até a eclosão do ovo e seus primeiros dias de vida (Valle 1993; Atella et al 2005). Em organismos desafiados imunologicamente pode ocorrer realocação de recursos energéticos que previamente seriam destinados para reprodução (Stahlschmidt et al 2013). Por meio de observação direta, verificamos que os ovos de pares infectados por *T. cruzi* (30-25°C) ou *T. rangeli* frequentemente apresentavam deformações e/ou aparentavam ser menores em comparação aos de casais não infectados. Por esse motivo, nós avaliamos se a qualidade dos ovos produzidos por insetos infectados e a sobrevivência das correspondentes ninfas recém-eclodidas poderiam ser diminuídas. Diante disso, o peso, comprimento e largura dos ovos postos foram os primeiros parâmetros avaliados. Os ovos postos apresentaram uma diminuição nesses parâmetros, tanto nas infecções por *T. cruzi*, quanto por *T. rangeli*. Stahlschmidt e colaboradores (2013) mostraram, em organismos muito distintos, *Gryllus texensis* Cade & Otte, 2000 que quando esses são desafiados imunologicamente com a bactéria *Serratia marcescens*, e sob diferentes regimes alimentares (alimentação *ad libitum* vs. alimentação intermitente), não apresentam diferenças

na área dos ovos quando comparados aos grilos não desafiados, independentemente do regime alimentar.

Uma vez demonstrado que a infecção crônica promove uma diminuição no tamanho dos ovos postos, decidimos testar se a infecção também afetava o conteúdo proteico dos mesmos. As infecções por *T. cruzi* (30-25°C) e *T. rangeli* induziram reduções significativas na quantidade total de proteínas presente nos ovos. Stahlschmidt et al (2013) também encontraram reduções nesse parâmetro estudando grilos infectados com *S. marcescens*. Adicionalmente, foi demonstrado que nos ovários de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, 1901 infectados por *Plasmodium yoelii nigeriensis* ocorre uma redução no conteúdo total de proteínas (Hogg et al 1997), sugerindo que o parasito possa afetar a vitelogênese do vetor. Quantitativamente, as proteínas são consideradas os principais constituintes dos ovos. Além do seu papel estrutural, as proteínas funcionam como enzimas, são utilizadas para o transporte e estocagem de nutrientes, funcionam como receptoras e também podem ser utilizadas como fonte de energia (Chapman 2013). Por esse motivo, em indivíduos infectados a oogênese pode ser afetada, já que é provável que parte dessas moléculas obtidas pelo hospedeiro seja utilizada pelo parasito (Hurd 2001). Além de proteínas, os ovos contêm lipídeos, açúcares e uma série de outros componentes nutricionais (Atella et al 2005). Todas essas substâncias, após a fertilização, vão sendo utilizadas gradualmente de acordo com a necessidade do embrião (Atella et al 2005). Nossos resultados sugerem que a menor produção de ovos e a sua menor qualidade são um reflexo direto da exploração de recursos pelas populações de parasitos presentes no intestino e na hemocele (no caso de *T. rangeli*) dos insetos.

A infecção por cada uma das duas espécies de tripanosomas afetou a produção, a qualidade e a viabilidade dos ovos postos por *R. prolixus*, mas não o tempo de incubação e a resistência das ninfas ao jejum. A ausência de efeitos da infecção sobre as ninfas de primeiro estágio parece indicar que se trata de um processo do tipo *tudo ou nada*, que faz com que uma vez que o desenvolvimento do embrião seja finalizado, a viabilidade do mesmo não seja mais sensível às consequências da infecção parental. De maneira semelhante, Stahlschmidt et al (2013) não encontraram diferenças no tempo de incubação de ovos de grilos desafiados por bactérias, nem na resistência das ninfas ao jejum. Para uma afirmação mais precisa de que os efeitos das infecções estariam restritos apenas ao desenvolvimento embrionário seriam necessários ensaios adicionais para avaliar possíveis custos que poderiam, por exemplo, acarretar dificuldades na ecdise ou na habilidade de obter um repasto sanguíneo.

Como mencionado acima, a perda de recursos nutricionais devido à infecção por patógenos pode acarretar um custo em termos reprodutivos devido à falta de um conjunto de

substâncias necessárias para a produção de ovos, que no caso dos insetos infectados é utilizado pelas populações de parasitos no seu desenvolvimento. Outra hipótese a ser considerada, e que poderia ocorrer independente ou paralelamente à anterior, propõe que os insetos infectados utilizariam parte dos seus recursos energéticos na manutenção da sua resposta imunológica, fato que acarretaria custos energéticos adicionais. A fenoloxidase, por exemplo, importante enzima na resposta imune dos invertebrados, é capaz de acarretar danos oxidativos em tecidos internos ou diminuir a funcionalidade de enzimas envolvidas na reprodução (Sadd & Siva-Jothy 2006; Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar 2012). A existência de um balanço energético entre reprodução e imunidade já foi demonstrada em alguns organismos, tanto vertebrados (French et al 2007) quanto invertebrados (Adamo et al 2001; Stahlschmidt et al 2013). Nossos resultados suportam a hipótese de uma compensação obrigatória entre reprodução e imunidade, uma vez que o *trade-off* entre esses dois fatores seria independente da disponibilidade de recursos alimentares (Stahlschmidt et al 2013). Por outro lado, a compensação facultativa ocorre quando a relação entre reprodução e imunidade é dependente da quantidade de alimento disponível, o que parece não acontecer no nosso estudo em que os insetos tiveram acesso a alimento *ad libitum*.

O sucesso reprodutivo é diretamente relacionado ao sucesso adaptativo dos insetos. O reconhecimento e encontro do parceiro sexual, e o subsequente acasalamento, são elementos indispensáveis para esse fim. Vitta (2009) e Pontes (2010) estudaram, respectivamente, o comportamento sexual de *T. brasiliensis* e *R. prolixus*, duas espécies importantes do ponto de vista epidemiológico. Essas autoras descreveram detalhadamente diversos aspectos do comportamento de triatomíneos relacionados com o contexto sexual tais como a atividade locomotora de adultos, a origem e função dos sinais que promovem o início de voo de machos, a sua orientação durante a locomoção a pistas químicas emitidas por fêmeas e sua agregação em torno de casais em cópula. Apesar disso, não existem estudos que abordem possíveis efeitos da infecção por tripanosomas sobre estes e outros aspectos do comportamento sexual. O presente estudo representa o primeiro trabalho a avaliar o efeito dos tripanosomas no comportamento reprodutivo de triatomíneos. De modo geral, nossos resultados indicam que a infecção por tripanosomas afeta as interações sexuais de *R. prolixus*.

Nos ensaios sem escolha, a frequência, o tempo para o início e a duração da cópula foram alterados em insetos infectados por *T. rangeli*, não tendo sido observados efeitos significativos de *T. cruzi* sobre esses parâmetros. Além disso, a frequência de cópula somente foi reduzida quando ambos o macho e a fêmea estavam infectados com *T. rangeli*. A diminuição na frequência de cópula observada nesses insetos poderia explicar, ao menos

em parte, a diminuição da fecundidade e fertilidade também observada para os casais infectados. De fato, tem sido demonstrado que uma maior frequência de cópula promove um aumento da fecundidade em triatomíneos (Brasileiro 1982; Asin et al 1992; Daflon-Teixeira et al 2009). Sugere-se que a pior performance reprodutiva observada nos triatomíneos infectados também pode ter sido decorrente de uma diminuição dos recursos nutricionais devida à sua utilização pelos parasitos e à manutenção de resposta imunológica do inseto (Dettloff et al 2001; Cheon et al 2008; Ardia et al 2012). De maneira geral, os custos da reprodução animal incluem os gastos energéticos com a produção de ovos e a cópula (Fowler & Partridge 1989; Chapman et al 1995; Yanagi & Miyatake 2003).

Foram observados que muitos dos casais infectados por *T. rangeli* permaneceram na arena experimental sem interagir fisicamente. Tal fato sugere que esses insetos não estariam receptivos para a cópula. Como mencionado anteriormente, uma vez na hemolinfa *T. rangeli* pode ser encontrado em todo o corpo do inseto afetando diferentes parâmetros fisiológicos (Grewal 1957; Tobie 1970; Añez 1984). A sua presença poderia também causar alterações na produção, emissão ou detecção de feromônios nos indivíduos infectados. Dessa forma, um conhecimento mais detalhado seria necessário para avaliar se existem alterações nestes processos, assim como estudar se há uma regulação de genes envolvidos no controle do comportamento sexual de triatomíneos induzida pela infecção por estes parasitos. O tempo para o início da cópula foi três vezes mais prolongado após infecção por *T. rangeli*. Esses resultados demonstram que a infecção por *T. rangeli* afeta negativamente as fases de pré-cópula do comportamento sexual de *R. prolixus*, sugerindo que sinais sexuais fundamentais na concreção da cópula (Pontes et al. 2008) pode estar alterados nos insetos infectados. Coincidentemente, a duração da cópula foi reduzida em cerca de 7 minutos em pares com o macho ou com os dois insetos infectados. Uma vez que a duração da cópula pode ser um indicador do investimento do macho em ejaculação (Friberg 2006; Nandy et al 2012), uma redução desse parâmetro poderia implicar que a transferência de espermatozoides para a fêmea foi diminuída, afetando consequentemente, o *fitness* de machos infectados. Tal possibilidade deverá ser avaliada em experimentos futuros.

Para que a cópula aconteça, o macho deve posicionar corretamente sua genitália, lateralizando seu corpo em relação ao corpo da fêmea e unindo o edeago com a genitália feminina (Manrique & Lazzari 1994; Manrique & Schilman 2000; Pires et al 2004; Vitta & Lorenzo 2009). A possibilidade da ocorrência de uma alteração anatômica das genitálias em consequência da infecção, em um ou ambos os sexos, poderia prejudicar ou mesmo impedir o acasalamento. Por meio de observação direta durante os experimentos com

R. prolixus infectados por *T. rangeli*, foi verificado que alguns dos pares que não copulavam ficavam em posicionamento de cópula (i.e. machos lateralizados, genitálias próximas e em posicionamento pré-cópula), mas as genitálias não se tocavam. Uma vez que a infecção por *T. rangeli* promove diversas alterações morfológicas nos insetos infectados (Grewal 1957; Watkins 1971), seria pertinente avaliar se a infecção afeta a anatomia dos órgãos genitais. Segundo Tomalak et al (1984), a infecção pelos nematoides *Parasitaphelenchus papillatus* Fuchs, 1937 e *Parasitorhabditis piniperdae* (Fuchs, 1937) acarreta danos estruturais nas genitálias do besouro *Tomicus piniperda* (Linnaeus, 1758). Adicionalmente, Ianora et al (1987) demonstraram que os efeitos da infecção por dinoflagelados dos gêneros *Atelodinium* e *Blastodinium* nos hospedeiros copépodos *Paracalanus parvus* (Claus, 1863) são ainda mais severos, pois os parasitos causam a sua castração.

Infecções por parasitos têm efeitos amplamente reconhecidos na cópula de insetos (Pai & Yan 2003; Polak et al 2007; Khan & Prasad 2013). No nosso estudo, mesmo com as significativas reduções da frequência de cópula nos insetos infectados por *T. rangeli*, uma proporção relevante dos pares infectados copulou. Maior ainda foi a proporção de cópulas observadas em pares infectados por *T. cruzi*, que atingiu valores semelhantes aos observados com pares não infectados. Entretanto, nestes ensaios os insetos não tiveram opção de escolher parceiro, uma vez que apenas um macho e uma fêmea foram liberados na arena. Sabendo-se que os triatomíneos vivem agrupados em pequenas colônias em refúgios protegidos (Wigglesworth 1950) e que machos de triatomíneos agregam ao redor de pares em cópula (Baldwin et al 1971; Manrique & Lazzari 1995; Pontes & Lorenzo 2012), o nosso próximo passo foi avaliar se a infecção de um potencial parceiro sexual afetava a escolha de insetos não infectados. Surpreendentemente, diante da escolha, tanto fêmeas quanto machos não infectados preferiram copular com parceiros livres da infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli*. Se o custo da cópula é alto para os machos e a variação da qualidade das fêmeas é considerável na população, espera-se que a cópula com fêmeas que apresentem sinais que indiquem um melhor valor adaptativo seja priorizada. Diversos trabalhos avaliaram a variação da escolha relacionada à idade, ao estado fisiológico e à fecundidade em insetos (Pitafi et al 1995; Katvala & Kaitala 2001; Nandy et al 2012). Em algumas espécies, por exemplo, os machos transferem maior quantidade de esperma quando encontram fêmeas maiores (Gage & Bernard 1996; Lupold et al 2011). De maneira semelhante ao observado no nosso estudo, machos de *D. melanogaster* copulam preferencialmente com fêmeas não infectadas por *S. marcescens* (Khan & Prasad 2013). Vale ressaltar que esse patógeno diminui o potencial reprodutivo das moscas. No entanto, apesar de escolhas de parceiros sexuais num

contexto de infecção por patógenos terem sido descritas (Khan & Prasad 2013; o presente estudo), essas parecem ser raras nos insetos já que na maioria dos casos não se observa discriminação de parceiros em função da infecção (Pai & Yan 2003; Lietze et al 2007; Rosengaus et al 2011; Maniania et al 2013).

O fato de que indivíduos não infectados parecem detectar a infecção dos coespecíficos sugere a existência de alterações nos mecanismos que regulam o processo de reconhecimento de parceiro sexual. Independentemente do processo que promove estas alterações, entretanto, a consequência disso seria a diminuição do *fitness* de insetos infectados que tenderiam a não copular e sendo assim, a não se reproduzir. A ausência de cópula poderia ser, no entanto, benéfica para os parasitos. Uma vez que tanto *T. cruzi* quanto *T. rangeli* não são transmitidos verticalmente, qualquer gasto com reprodução do hospedeiro seria potencialmente negativo para o seu crescimento. Além disso, diversos trabalhos mostram uma relação direta entre reprodução e diminuição da longevidade em insetos (Stearns 1989; Partridge et al 1999; Vézilier et al 2012; ver revisão De Loof 2011). No caso de triatomíneos infectados por tripanosomas um aumento da longevidade promovido por uma redução na reprodução poderia aumentar a probabilidade de transmissão dos parasitos.

Na maioria dos insetos, o encontro e reconhecimento do parceiro sexual são mediados por feromônios que podem ser produzidos por indivíduos de um ou ambos os sexos (Gullan & Cranston 2008). A presença dos parasitos poderia afetar funções críticas como a produção, emissão e/ou recepção de feromônios. Com isso, indivíduos infectados não seriam capazes de atrair parceiros tão eficientemente como aqueles sem infecção. Sabe-se que os feromônios sexuais podem desencadear reações comportamentais no sexo oposto a curtas e longas distâncias (Shorey 1973) e que a produção, liberação e recepção dos feromônios são dependentes da idade, estado fisiológico e fatores ambientais (McNeil 1991; Gullan & Cranston 2008). Os estudos em feromônios sexuais de triatomíneos avançaram nas últimas décadas (Baldwin et al 1971; Manrique & Lazzari 1995; Manrique et al 2006; Pontes et al 2008, Vitta 2009; Zacharias et al 2010; Pontes & Lorenzo 2012; Pontes et al 2013; May-Concha et al 2013). Baldwin et al (1971) em *R. prolixus* e Manrique & Lazzari (1995) em *T. infestans* mostraram que casais em cópula emitem voláteis que promovem a agregação de machos. Posteriormente foi identificado que as glândulas metasternais das fêmeas são a fonte dos feromônios sexuais e que os odores emitidos por essas glândulas induzem a saída dos abrigos e o início de voo dos machos (Crespo & Manrique 2007; Pontes 2010; Zacharias et al 2010). Dessa forma, cabe avaliar se a

infecção interfere na produção de feromônios, promovendo as alterações observadas na frequência de cópula com indivíduos infectados.

Outros tipos de sinais químicos tais como os feromônios de contato existentes na cutícula dos insetos podem mediar a cópula (Howard & Blomquist 2005). Hidrocarbonetos, álcoois ou ésteres de ácidos graxos são alguns exemplos. Os hidrocarbonetos cuticulares podem mediar a agregação e o reconhecimento de indivíduos do sexo oposto e parecem desempenhar um papel importante na cópula. A utilização desses mecanismos semelhantes já foi demonstrada em diversas espécies de insetos (Schal et al 1990; Ferveur et al 1996; Barbour et al 2007). Para os triatomíneos foi observado que substâncias químicas emitidas pelas fêmeas são necessárias para disparar as tentativas de cópula dos machos (Cocchiaro-Bastias et al 2011). Sendo assim, alterações dos sinais químicos existentes na cutícula de triatomíneos poderiam ser outra via de detecção de parceiro sexual potencialmente interferida pela infecção e tal possibilidade deverá ser avaliada em estudos futuros. Como pode ser visto, diversas hipóteses concorrem para explicar efeitos da infecção por tripanosomas sobre o comportamento sexual dos triatomíneos, tais como a diminuição da frequência de cópula e a escolha de parceiros livres de infecção. Os resultados aqui descritos abrem um leque de possibilidades de estudos que deverão ser avaliados no futuro.

Aspectos relacionados à locomoção e dispersão de insetos infectados podem fornecer informações relevantes para compreender a dinâmica de transmissão de doenças e sua dispersão em escala local. O voo é um dos mecanismos de dispersão utilizados pelos triatomíneos para a busca de hospedeiros, sendo que já foi mostrado, por exemplo, que a frequência de voo aumenta com o jejum (Lehane et al 1992; McEwen & Lehane 1993). Dessa maneira, o voo acaba mediando a colonização de novos habitats, incluindo os ambientes domésticos (Lehane & Schofield 1976; Vazquez-Prokopec et al. 2004; Ceballos et al 2005). Recentemente, um novo aspecto da biologia dos triatomíneos relacionado com a sua dispersão foi descoberto, evidenciando que machos de pelo menos duas espécies dessa subfamília iniciam o voo em resposta a odores emitidos pelas fêmeas (Vitta, 2009; Zacharias et al, 2010). Assim, os processos de colonização de novos ambientes se veriam acelerados pelo fato da chegada de parceiros sexuais em busca de fêmeas colonizadoras, já que estas dependem do acesso frequente a espermatozoides para desenvolver uma reprodução mais eficiente (Brasileiro 1982; Asin et al 1992; Daflon-Teixeira et al 2009). Diante da relevância do voo para os insetos deste grupo, o último parâmetro aqui avaliado foi a frequência de início de voo de *R. prolixus* diante da infecção por tripanosomas.

No presente estudo foi demonstrado que, de maneira geral, as infecções por *T. cruzi* e *T. rangeli* afetam negativamente a frequência de início de voo em *R. prolixus*. Independentemente do sexo, os insetos sem infecção iniciaram o voo mais frequentemente do que aqueles infectados pelos tripanosomas. A frequência dessa atividade foi diminuída significativamente em machos e fêmeas infectados por *T. rangeli*. Adicionalmente, a infecção por *T. cruzi* diminuiu significativamente a frequência de início de voo de fêmeas, mostrando uma sutil redução dessa atividade nos machos. De acordo com os dados da literatura, a proporção de insetos que voam na ausência de estímulos a cada noite é alta, ficando em torno de 40% (Minoli & Lazzari 2006; Zacharias et al 2010). Coincidentemente, a proporção de insetos dos grupos controle que voaram no presente estudo foi semelhante. A significativa redução das tentativas de voo nos insetos infectados poderia ser um reflexo da queda dos recursos nutricionais proposta anteriormente. Sabe-se que o voo é uma atividade que requer grande quantidade de energia (Candy et al 1997). De fato, a utilização de lipídeos e carboidratos para a manutenção do voo tem sido confirmada em triatomíneos (Gringorten & Friend 1979a; Ward et al 1982; Canavoso et al 2003). Em *R. prolixus* alimentados, as reservas nutricionais remanescentes do 5º estágio são utilizadas para o desenvolvimento do trato reprodutivo e dos músculos do voo (Gringorten & Friend 1979b). Num cenário de escassez nutricional, iniciar o voo na ausência de pistas químicas possivelmente talvez incida negativamente nas chances de sobrevivência do inseto e, conseqüentemente, dos parasitos que alberga. Sugere-se, portanto, que a queda observada na frequência de voo de insetos infectados tenha relação direta com uma baixa disponibilidade de recursos metabólicos. Estudos futuros se tornam necessários para avaliar se a redução da frequência de início de voo se manteria na presença de pistas tanto de hospedeiros, quanto de parceiros sexuais.

É possível sugerir que os insetos infectados têm seu desempenho locomotor diminuído, mas tal hipótese não parece ser válida no presente estudo. Durante a avaliação do início de voo observamos que os insetos infectados apresentaram um número maior de tentativas de voo falhas. Assim, a possibilidade de uma diminuição da locomoção não parece coerente com os níveis de atividade observados nas fitas de vídeo. Além disso, um aumento na atividade locomotora de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* infectadas por *T. rangeli* tem sido demonstrado pelo nosso grupo (Marlière et al 2011). Entretanto, esses mesmos autores mostraram que as infecções por *T. cruzi* diminuíram a atividade locomotora dos triatomíneos. No nosso estudo, a razão entre fracassos e sucessos apresentados no início de voo é maior para os insetos infectados por ambos os parasitos. No entanto, nas infecções por

T. rangeli essa razão foi de aproximadamente 8 vezes, superior a de 3 vezes observada nas infecções por *T. cruzi*. Independente dos fatores que levaram aos insetos infectados a diminuir sua frequência de início de voo, o resultado provavelmente sugere que a infecção promove limitações na capacidade de dispersão desses insetos. Cabe salientar que é provável que tal consequência afete a sobrevivência dos insetos, bem como a dos seus parasitos. Futuros estudos deverão determinar se isso representa um custo que afeta a ambos, o hospedeiro e seu parasito.

É importante ressaltar que os ensaios do presente estudo não avaliaram o voo em si. Alterações no voo de insetos causadas pela infecção por parasitos têm sido demonstradas em diferentes modelos (Jutsum & Goldsworthy 1974; Seyoum et al 1994; Lee et al 2000). As cigarras *Magicicada septendecim* (Linnaeus, 1758) percorrem menores distâncias durante o voo quando infectadas pelo fungo *Massospora cicadina* Peck (White et al 1983). As infecções pelo nematoide *Mermis nigrescens* Dujardin, 1842 reduzem a performance de voo dos machos do gafanhoto *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758), efeito que é acompanhado de uma diminuição nos lipídeos disponíveis nos músculos do voo (Jutsum & Goldsworthy 1974). Finalmente, sabe-se que as fêmeas de *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 infectadas pelo vírus da encefalite equina oriental voam por menos tempo que fêmeas sadias (Lee et al 2000).

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que vários aspectos relacionados com o *fitness* de *R. prolixus* podem ser alterados devido às infecções por tripanosomas. De maneira geral, esses efeitos são mais evidentes diante da infecção por *T. rangeli*. Entretanto, não é possível ainda sugerir que essa redução favoreça a transmissão do parasito. A necessidade de crescimento por parte dos parasitos, associada a provável tentativa de contenção desse crescimento por parte dos insetos, sugerem a existência de um conflito latente nas interações entre os parasitos estudados e seus vetores triatomíneos. Isso poderia levar ao desenvolvimento de estratégias para lidar com as reações de defesa mútuas em ambos os organismos. Sendo assim, sugere-se que estudos devam ser desenvolvidos para testar se os triatomíneos apresentam respostas comportamentais que lhes permitam controlar as populações de tripanosomas que os infectam, por exemplo, através da escolha ativa por temperaturas ambientais inadequadas para os parasitos. Por outro lado, deve também ser avaliada a possibilidade de que os tripanosomas manipulem ativamente o comportamento dos insetos, no sentido oposto e para seu próprio benefício.

6 CONCLUSÕES

- Em geral, *R. prolixus* infectados por *T. cruzi* ou *T. rangeli* apresentam limitações do seu comportamento e fisiologia estreitamente relacionadas com a manutenção do *fitness*.

Fecundidade e fertilidade

- Para ambos os parasitos, os efeitos da infecção são dependentes do tempo de infecção.

- Nas infecções por *T. cruzi*, os efeitos no valor E e na taxa de eclosão são dependentes da temperatura na qual os insetos são criados.

- A infecção de *R. prolixus* por *T. rangeli* afetou negativamente todos os parâmetros reprodutivos avaliados (período de pré oviposição, valor E e taxa de eclosão); dessa maneira o parasito mostrou ter uma alta patogenicidade para o vetor, reduzindo seu *fitness*.

Qualidade dos ovos e ninfas recém-eclodidas

- Em geral, os parasitos aqui avaliados afetam negativamente a qualidade dos ovos de *R. prolixus*.

- Particularmente, a infecção por *T. cruzi* (30-25°C) reduz o comprimento, a largura e a quantidade de proteínas totais dos ovos de *R. prolixus*.

- A infecção por *T. rangeli* diminui o peso, a largura e a quantidade de proteínas totais dos ovos de *R. prolixus*.

- O tempo de eclosão dos ovos de pares infectados por *T. cruzi* (30-25°C) ou *T. rangeli* não é afetado.

- As ninfas recém-eclodidas de ovos postos por pares infectados por *T. cruzi* (30-25°C) ou *T. rangeli* não apresentam limitações na sua sobrevivência ao jejum.

Cópula

- Em geral, as infecções por *T. cruzi* (30-25°C) e *T. rangeli* afetam o comportamento sexual de *R. prolixus*.

- As infecções por *T. cruzi*, independentemente da temperatura de criação, não reduzem significativamente a frequência de cópula de *R. prolixus*.
- As infecções por *T. rangeli* acarretam uma diminuição na frequência de cópula de *R. prolixus*.
- Pares infectados por *T. rangeli* demoram mais para iniciar a cópula e apresentam cópulas mais breves.
- As infecções por *T. cruzi* (30-25°C) e *T. rangeli* influenciam a escolha tanto de machos, quanto de fêmeas. Indivíduos não infectados de ambos os sexos preferem copular com parceiros não infectados por tripanosomas.

Início de voo

- Em geral, as infecções por *T. cruzi* (30-25°C) ou *T. rangeli* diminuem a frequência de início de voo de *R. prolixus*.
- Quando infectadas por *T. cruzi* (30-25°C), somente as fêmeas apresentam uma queda significativa na frequência de início de voo.
- A infecção por *T. rangeli* promove uma diminuição na frequência de início de voo, tanto nos machos, quanto nas fêmeas.
- As infecções por *T. cruzi* (30-25°C) e *T. rangeli* aumentam a frequência de fracassos no início do voo, sendo as diferenças mais evidentes nos insetos infectados por *T. rangeli*.

7 ANEXO

7.1 Artigo publicado

Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot, SL, Carrasco D, Guarneri AA 2014. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One* 9(8): e105255 doi:10.1371/journal.pone.0105255.



Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*

Maria Raquel Fellet¹, Marcelo Gustavo Lorenzo¹, Simon Luke Elliot², David Carrasco³,
Alessandra Aparecida Guarneri^{1*}

1 Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Department of Entomology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, **3** Unit of Chemical Ecology, Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden

Abstract

The insect *Rhodnius prolixus* is responsible for the transmission of *Trypanosoma cruzi*, which is the etiological agent of Chagas disease in areas of Central and South America. Besides this, it can be infected by other trypanosomes such as *Trypanosoma rangeli*. The effects of these parasites on vectors are poorly understood and are often controversial so here we focussed on possible negative effects of these parasites on the reproductive performance of *R. prolixus*, specifically comparing infected and uninfected couples. While *T. cruzi* infection did not delay pre-oviposition time of infected couples at either temperature tested (25 and 30°C) it did, at 25°C, increase the e-value in the second reproductive cycle, as well as hatching rates. Meanwhile, at 30°C, *T. cruzi* infection decreased the e-value of insects during the first cycle and also the fertility of older insects. When couples were instead infected with *T. rangeli*, pre-oviposition time was delayed, while reductions in the e-value and hatching rate were observed in the second and third cycles. We conclude that both *T. cruzi* and *T. rangeli* can impair reproductive performance of *R. prolixus*, although for *T. cruzi*, this is dependent on rearing temperature and insect age. We discuss these reproductive costs in terms of potential consequences on triatomine behavior and survival.

Citation: Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA (2014) Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. PLoS ONE 9(8): e105255. doi:10.1371/journal.pone.0105255

Editor: Juan Carlos Pizarro, Tulane University, United States of America

Received: April 8, 2014; **Accepted:** July 21, 2014; **Published:** August 19, 2014

Copyright: © 2014 Fellet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (AAG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (AAG and MGL), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (AAG and MGL), Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas René Rachou (MRF, AAG and MGL) and Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (AAG). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors confirm that co-author Marcelo Gustavo Lorenzo is a PLOS ONE Editorial Board member. The changes in the manuscript do not alter our adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

* Email: guarneri@cpqrr.fiocruz.br

Introduction

Chagas disease is a severe infection whose etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). This parasite is transmitted to humans by insect vectors belonging to the subfamily Triatominae and the main tool to combat transmission of this disease is vector control, based on extensive use of residual insecticides [1,2]. *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) Stål, 1859 is considered the primary vector of Chagas disease in Venezuela and Colombia but has also been responsible for disease transmission in much of Central America [3–5]. Beyond transmitting *T. cruzi*, this triatomine can also be infected by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, a protozoan that does not cause disease to humans. This parasite does, however, share surface antigens with *T. cruzi* [6], potentially leading to serological cross-reactivity and so misleading diagnosis of Chagas disease [7,8].

These two parasites have distinct tropisms in the insect - *T. cruzi* multiplies exclusively in the digestive tract while *T. rangeli* initially infects insects through a similar process but is eventually able to

cross the gut epithelium and invade the hemocoel and salivary glands [9]. To grow and multiply, parasites must obtain nutritional resources from their insect hosts. As a consequence, hosts may reorganize metabolic pathways and invest some of their energetic reserves in parasite elimination [10,11, for review see 12]. Therefore, parasite infections have the potential to affect their insect hosts in various ways, directly or indirectly, with possible effects on fitness [13–16].

Conventionally, *T. cruzi* has been considered to be non-pathogenic to its insect hosts [17–20]: it normally does not increase mortality rates under optimal conditions (e.g. with unlimited food) [18], injure intestinal tissues [19] or even affect populations of symbionts [20]. There have, though, been some reports of alterations in developmental parameters [21,22] and reproduction [23] of infected insects, depending on the parasite strain and the conditions to which insects were submitted, while some authors also suggest that the parasite may influence wing morphology [24] and dispersion patterns [25].

In contrast to *T. cruzi*, *T. rangeli* is known to be pathogenic to triatomines [9,26–32]: generally, infected insects have difficulties

feeding [33] and have increased mortality [32,34] while those that survive have longer development times [15] and are damaged during ecdysis, leading to altered morphology [25,35]. In addition, it has been shown that *T. rangeli* can reduce symbiont populations [26,28] producing several negative effects on insect development [20].

Most studies to date have focused on effects of *T. cruzi* and *T. rangeli* on insect development, longevity and survival. In addition, there are still several controversies regarding the effect of these parasites on the fitness of triatomines. At least some of the differences in the results might be explained by the use of different methodologies and strains and evaluation of the infection of indistinct species of insects and for short periods. In the case of *T. rangeli*, to our knowledge, there are no studies to date showing the effects of the parasite on triatomine reproductive parameters.

We therefore infected *R. prolixus* with *T. cruzi* or *T. rangeli* and examined the effects of these parasites on reproductive aspects of adults. We evaluated pre-oviposition time (time to lay the first egg), the e-value (the insects' capacity to convert ingested blood into eggs) and egg viability. Since in the field triatomines can remain infected for long periods, the effect of infection on aspects of fitness was evaluated over several reproductive cycles. Our results indicate that these parasites affect, to differing degrees, most reproductive aspects we investigated.

Materials and Methods

Triatomines

All *R. prolixus* used in assays were obtained from a laboratory colony. This colony is derived from insects collected in Honduras around 1990. The colony was maintained by the Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group in Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, MG, Brazil. Triatomines were reared, until infection, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ RH and kept under a natural illumination cycle.

Ethics Statement

Before and after infection, in all instars, insects were fed on Swiss mice under Thiopental 2.5% anesthesia to minimize animal suffering. To infect the insects we used citrated rabbit blood obtained from Cecal (Centro de Criação de Animais de Laboratório) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ, Brazil. All experiments using live animals were performed in accordance to FIOCRUZ guidelines on animal experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/FIOCRUZ) under the approved protocol number L-058/08. The protocol is from CONCEA/MCT (<http://www.cobea.org.br/>), which is associated with the American Association for Animal Science (AAAS), the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), the International Council for Animal Science (ICLAS) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC).

Parasites

Trypanosoma cruzi (CL strain) and *T. rangeli* (CHOACHI strain) epimastigotes were used to infect insects. These parasites were first isolated from naturally infected *T. infestans* [36] and *R. prolixus* [37], respectively. Most studies of the interaction between *T. cruzi* and *R. prolixus* use the DM28 strain (11 studies from a total of 13 found), which was originally isolated from the opossum *Didelphis marsupialis* [38]. The CL strain was chosen for the present study since it was isolated from a triatomine bug (rather than a vertebrate), albeit a distinct genus. The strains were

cultured by two weekly passages in liver-infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 15% fetal bovine serum, 100 mg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin [15].

Infection by trypanosomes

Infection by *T. cruzi* was induced in second instar nymphs (8 ± 2 days old) to ensure a chronic infection in the adult phase. Inactivated (56°C , 30 min) citrated rabbit blood containing 5×10^5 parasites/ml was offered to triatomines at 37°C through an artificial feeder. Control group insects received parasite-free blood under the same conditions. The blood was stirred every 20 minutes to ensure homogeneity of parasite distribution during *ad libitum* bug feeding. Subsequently, insects that had fed to repletion were selected for the experiments. After this procedure, insects were split in two groups: one that was maintained in a chamber at 25°C during nymphal development and also after imaginal moult, hereafter called 25–25 $^\circ\text{C}$, and another that was maintained in a chamber at 30°C during nymphal development and transferred to 25°C after imaginal moult, hereafter called 30–25 $^\circ\text{C}$. Insects were maintained in 12:12/L:D. The intention in rearing a group at 30°C was to induce a higher parasite load in these insects. Briefly, the previous experiments were performed in our laboratory and have proven that the growth rate of *T. cruzi* cultures is linearly and positively dependent on temperature over the range of 20–30 $^\circ\text{C}$ [unpublished data]. Infection status was confirmed for all insects used in the experiments through microscopic examination of a drop of urine after blood feeding at the 3rd instar. Insects were fed 8–10 days after each molt in order to ensure continuity of infection [39,40].

Similarly, infection by *T. rangeli* was achieved by feeding 3rd instar nymphs (8 ± 2 days old) through an artificial feeder on inactivated (56°C , 30 min) citrated rabbit blood at 37°C , containing 1×10^5 parasites/ml. Nymphs belonging to the control group received parasite-free blood offered in identical conditions. To ensure that all insects contained parasites in hemolymph, seven days after moulting to 4th instar, nymphs were inoculated in the side of the thorax with 1 μl of PBS (0.15 M NaCl 0.01 M sodium phosphate, pH 7.4) containing 2.5×10^4 parasites/ml. A 50 μl syringe (Hamilton, needle 13 \times 3.3; 1/2") connected to a dispenser (model 705, Hamilton Company, USA) was used to inoculate the parasites. Nymphs belonging to the control group were inoculated with the same volume of PBS. Twenty-four hours post-inoculum, insects were allowed to feed *ad libitum* on anesthetized Swiss mice.

Hemolymph examination was performed under the microscope to confirm the infection of all experimental insects. Control insects had a drop of hemolymph sampled in the same manner to ensure equivalent manipulation of the insects studied. Both groups of insects were always maintained in a chamber at 25°C and 12:12/L:D and are hereafter called *T. rangeli* 25–25 $^\circ\text{C}$. No experiment was performed with insects infected with *T. rangeli* and exposed to 30°C due to the fact that previous experiments performed in our laboratory have shown that the culture growth rate of these parasites presents a peak at intermediate temperatures, i.e., 25°C , over the range 20–30 $^\circ\text{C}$.

For all experiments, both with *T. cruzi* and *T. rangeli* infected insects, we promoted early infections to generate a chronic pathological profile on the insects. We suggest that evaluating reproductive performance on adults infected as younger instars would allow showing effects accumulated throughout their lifespan. Infections by *T. cruzi* or *T. rangeli* were not conducted at the same instar since our main purpose was not to compare the effects of different parasites. As *T. rangeli* infected insects needed the injection of parasites into their hemocoel after being orally infected, this had to be performed at a larger instar to avoid

mortality due to this damaging procedure. In the light of existing knowledge on triatomine-trypanosome interactions, there is no evidence of parasite-induced virulence being dependant on the instar infected.

Bioassays

Fifteen-day-old virgin adults (previously individualized as 5th instar nymphs) were individually weighed before and immediately after feeding on anesthetized mice for 30 minutes or until the total distension of abdomen. Afterwards, insects were sorted into breeding pairs which were maintained for 21 days in separate plastic containers (5.5×8.0 cm). Inside each container a circular piece of filter paper and a strip of cardboard were added as substrate and climbing structure. The container was sealed with cloth. The feeding procedure was repeated with the same insects every 21 days for three times. Intervals between feeding were defined as reproductive cycles. The insects remained inside the containers until the end of the experiments or female death. Dead males were not replaced and females were kept alone until the end of the experiments. Only data generated from insects that fed in each cycle were considered for the experiment. After the first imaginal meal, bugs that did not engorge were excluded and the final number of experimental pairs established for each group (trying to keep figures as even as possible). It is relevant to mention that data obtained with a small proportion of pairs had to be excluded from the datasets of the 2nd and 3rd oviposition cycles (both for control and infected groups) as they had either not fed or died. The numbers of pairs for which data were obtained in the 2nd and 3rd cycles is given in figures.

Several experimental series were conducted to examine the effect of infection on the fecundity and fertility of *R. prolixus*.

Four treatments were used to study the effect of infection by *T. cruzi*:

- uninfected pair (25–25°C) (n = 15 pairs);
- infected pair (25–25°C) (n = 19 pairs);
- uninfected pair (30–25°C) (n = 20 pairs);
- infected pair (30–25°C) (n = 20 pairs).

Two treatments were developed to study the effect of infection by *T. rangeli*:

- uninfected pair (25–25°C) (n = 20 pairs);
- infected pair (25–25°C) (n = 20 pairs).

The eggs produced by each pair were collected daily and transferred to a plastic microplate (24 wells). The following parameters were recorded for each pair: a) pre-oviposition time (number of days spent from pairing to laying the first egg); b) e-value for each reproductive cycle [41,42]; c) egg hatching rate for each reproductive cycle. The e-value is a variable that indicates the capacity of bugs to convert the ingested blood into egg production, taking in consideration the initial weight of the female in each cycle. This variable was calculated using the formula:

$$\text{E-value} = \frac{\text{Total number of eggs}}{\text{Initial female weight} \times \text{ingested blood}} \times 1000$$

Statistical Analysis

All the statistical analyses were done in R software 3.0.2 [43]. Pre-oviposition time was analysed using a Wilcoxon rank-sum test. The number of days until first oviposition (pre-oviposition time)

was compared between control and infected insects in every temperature and parasite species. Data on egg hatching rate and e-values (dependent variables) were analysed to compare the effects of: a) parasite infection (i.e. control *vs* infected insects) during three consecutive feeding cycles in every parasite treatment; b) *T. cruzi* infection (i.e. control *vs* infected insects) at two experimental temperatures (i.e. 25°C *vs* 30°C); and c) infection (i.e. control *vs* infected insects) of either parasite species (i.e. *T. cruzi* and *T. rangeli*) at the same temperature (i.e. 25°C). The variable individual was set as a random effect to account for repeated measures. Hatching rate data were analysed by a binomial generalized mixed-effects model (function `glmer()` in “lme4” package) [44] using “logit” as a link function. E-value data were analysed with a linear mixed-effects model (function `lme()` in “nlme” package) [45]. Full models with an interaction term were fitted initially and they were reduced to main effects models if the interaction was not significant. The goodness-of-fit of the models was visually inspected using the residual plots. Overdispersion was also checked for all models. *Post-hoc* interaction contrasts (function `testInteractions()` in “phia” package, De Rosario-Martinez [46]) were performed to further explore the influence of each treatment in the data.

Results

Effect of trypanosome infection on *R. prolixus* reproduction

Pre-oviposition tim. Infection by *T. cruzi* did not affect the pre-oviposition time shown by females (Fig. 1A and 1B, Wilcoxon rank-sum test, $W = 178.5$, $P = 0.33$ and $W = 152.5$, $P = 0.30$, respectively at 25–25°C or 30–25°C). Infection of females by *T. rangeli*, however, induced a 2 day delay in their pre-oviposition time in comparison to uninfected females (Fig. 1C, Wilcoxon rank-sum test, $W = 90.5$, $P < 0.01$).

E-value and fertility of insects infected by *T. cruzi* 25–25°C. For *T. cruzi* 25–25°C a significant interaction between infection and cycle was observed in the e-value (Linear mixed-effects model, $P = 0.01$), indicating that the effect of infection depends on adult age. *Post-hoc* tests indicated a significant increase in the e-value of infected insects during the second cycle when compared to controls (Fig. 2A, control = 2.57 ± 0.18 , infected = 3.45 ± 0.18 , $P = 0.004$). Additionally, the hatching rate observed for infected insects was marginally increased (Fig. 3A, control = 0.87 ± 0.01 , infected = 0.90 ± 0.01 , binomial generalized mixed-effects model, $P = 0.03$).

E-value and fertility of insects infected by *T. cruzi* 30–25°C. The analysis of the e-value of insects exposed to *T. cruzi* infection at 30–25°C revealed a strong interaction with the cycle, indicating that infection decreased the fertility of insects at particular phases of adult life (Linear mixed-effects model, $P < 0.001$). Infected pairs produced eggs less efficiently during the first reproductive cycle in comparison to controls (Fig. 2B, control = 4.02 ± 0.21 , infected = 2.83 ± 0.29 , $P < 0.001$). Nevertheless, no significant differences in e-values of control and infected insects were observed in the subsequent reproductive cycles ($P = 0.65$ for both cycles).

An interaction between infection and cycle was also seen in the egg hatching rates (Binomial generalized mixed-effects model, $P < 0.001$), indicating that the decrease in hatching success of eggs laid by infected pairs also depended on adult age. Results from *post-hoc* tests showed that the hatching rate of these insects decreased significantly in the third reproductive cycle as compared to that of control group insects (Fig. 3B, control = 0.94 ± 0.01 , infected = 0.67 ± 0.07 , $P < 0.001$).

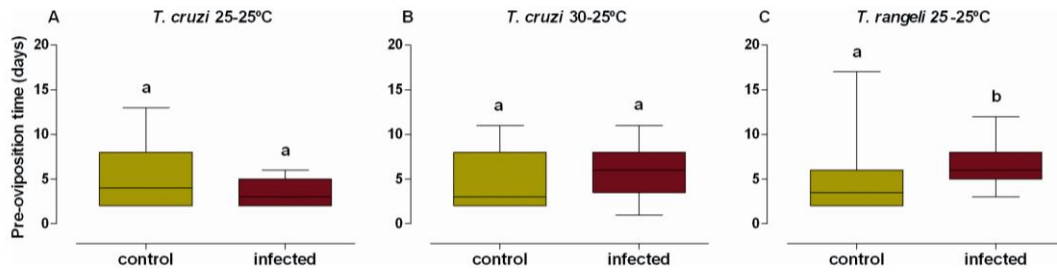


Figure 1. Pre-oviposition time of *R. prolixus* females infected. A) *T. cruzi* at 25–25°C; B) *T. cruzi* at 30–25°C and C) *T. rangeli* at 25–25°C. The median, quartiles and minimum and maximum numbers of days before the first oviposition are shown in each box plot. Data represent the mean \pm s.e. of 15 control and 19 *T. cruzi* 25–25°C infected pairs (A), 20 control and 20 *T. cruzi* 30–25°C infected pairs (B) and 20 control and 20 *T. rangeli* 25–25°C infected pairs (C). Green indicates data from control insects, while red indicates data from infected insects. Distinct letters above columns indicate significant differences in pre-oviposition time ($P < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0105255.g001

E-value and fertility of insects infected by *T. rangeli* 25–25°C. The e-value of *Trypanosoma rangeli*-infected insects was affected both by infection (Linear mixed-effects model, $P = 0.001$) and cycle ($P < 0.001$), but no significant interaction between the two treatments was observed. Figure 2C shows that *T. rangeli*-infected insects suffered a slight decrease in their e-value in all cycles compared to that shown by insects of the control group. Nevertheless, this difference was statistically significant during the second (control = 2.32 ± 0.24 , infected = 1.46 ± 0.30 ; $P = 0.04$) and third (control = 2.02 ± 0.19 , infected = 0.91 ± 0.14 , $P = 0.02$) cycles. Moreover, infection status and reproductive cycle showed interactive effects on hatching rates (Binomial generalized mixed-effects model, $P < 0.001$). In fact, parental infection by *T. rangeli* significantly decreased the hatching rate of eggs laid during the second (control = 0.82 ± 0.05 , infected = 0.56 ± 0.08 , $P = 0.006$) and third (control = 0.70 ± 0.05 , infected = 0.45 ± 0.10 , $P = 0.03$) cycles (Fig. 3C).

The effect of temperature on the outcome of *T. cruzi* infection

The e-value and fertility of insects infected by *T. cruzi* 25–25°C vs *T. cruzi* 30–25°C. A statistically significant interaction

between infection status and experimental temperature (Linear mixed-effects model, $P = 0.007$) indicates that *T. cruzi* affected the efficiency of egg production significantly depending on the temperature to which insects were exposed during nymphal phases. Although there were no significant differences in the e-value of control insects exposed to either temperature treatment ($P = 0.84$), infected insects exposed to 30–25°C experienced significant e-value reduction compared to those kept at 25–25°C (Fig. 4A, 25–25°C = 3.11 ± 0.14 , 30–25°C = 2.23 ± 0.12 , $P < 0.001$).

Similar results were encountered in egg-hatching rates. A significant interaction found after comparing hatching rates as a function of insect infection by *T. cruzi* and temperature (Binomial generalized mixed-effects model, $P = 0.02$) indicates that eggs laid by infected pairs vary their hatching success depending on the temperatures to which they were exposed. The hatching of eggs laid by infected insects exposed to 30–25°C was significantly lower when compared to that of bugs at 25–25°C (Fig. 4C, 25–25°C = 0.90 ± 0.01 , 30–25°C = 0.78 ± 0.04 , $P = 0.009$). A similar tendency was not observed in non-infected bugs ($P = 0.56$).

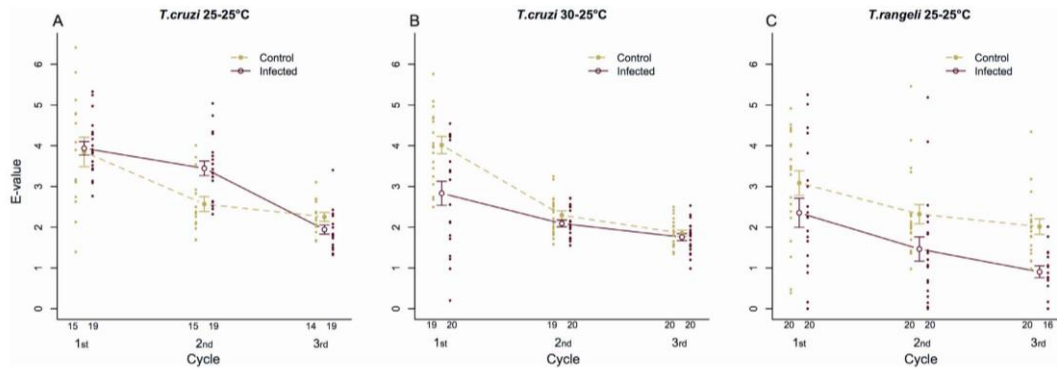


Figure 2. E-value of *R. prolixus* pairs infected. A) *T. cruzi* at 25–25°C; B) *T. cruzi* at 30–25°C and C) *T. rangeli* at 25–25°C. Data represent the mean e-value (\pm s.e.) of 15 control and 19 *T. cruzi* 25–25°C infected pairs (A), 20 control and 20 *T. cruzi* 30–25°C infected pairs (B) and 20 control and 20 *T. rangeli* 25–25°C infected pairs (C). Green indicates data from control insects, while red indicates data from infected insects. Cycles comprise periods of 21 days between meals and dots represent the e-value shown by each pair for a particular cycle. doi:10.1371/journal.pone.0105255.g002

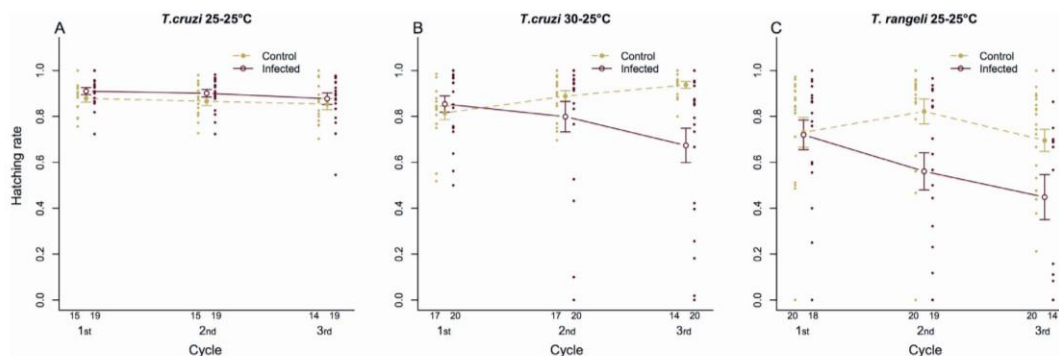


Figure 3. Hatching rate of *R. prolixus* eggs from pairs infected. A) *T. cruzi* at 25–25°C; B) *T. cruzi* at 30–25°C and C) *T. rangeli* at 25–25°C. Data represent the mean \pm s.e. of 15 control and 19 *T. cruzi* 25–25°C infected pairs (A), 17 control and 20 *T. cruzi* 30–25°C infected pairs (B) and 20 control and 19 *T. rangeli* 25–25°C infected pairs (C). Green indicates data from control insects, while red indicates data from infected insects. Cycles comprise periods of 21 days between meals and dots represent the hatching rate shown by each pair for a particular cycle. doi:10.1371/journal.pone.0105255.g003

The effect of different parasite infection

The e-value and fertility of insects infected by *T. cruzi* 25–25°C vs *T. rangeli* 25–25°C. The effects of infection on insects kept at the same temperature depended on parasite species, as reinforced by results obtained with insects infected by *T. cruzi* 25–25°C or *T. rangeli* 25–25°C (Linear mixed-effects model, $P=0.002$). In fact, infection by *T. rangeli* strongly decreased the e-value of insects compared to that of bugs infected with *T. cruzi* (Fig. 4B, *T. cruzi* = 3.11 ± 0.14 , *T. rangeli* = 1.62 ± 0.19 , $P<0.001$).

The egg-hatching rates were clearly influenced by parasite species (Binomial generalized mixed-effects model, $P=0.02$), as there was a hatching rate reduction on the eggs laid by *T. rangeli* infected pairs when compared to that of eggs laid *T. cruzi* infected insects (Fig. 4D, *T. cruzi* = 0.90 ± 0.01 , *T. rangeli* = 0.59 ± 0.05 , $P<0.001$).

Discussion

We initially aimed to evaluate reproductive performance effects of *T. cruzi* infection on *R. prolixus* adults. For this we chose to expose insects to temperatures they are known to prefer, i.e. 25°C [47]. We also evaluated whether parasite load would affect this outcome by comparing these results to those obtained with a group of insects held at 30°C to promote a higher parasitemia. Our results have shown for the first time that *T. cruzi* infection can impose costs on *R. prolixus* reproduction, which costs we would expect to see reflected in the insect's overall fitness. This seems to be the outcome of an interplay between parasite infection, insect age and environmental temperature. We have also shown that *T. rangeli* infection is costly for the reproductive performance of these bugs.

Curiously, while *T. rangeli* is generally considered a pathogen of triatomines [27,31,34], *T. cruzi* has been mostly considered non-pathogenic to its insect vectors [17,18,20]. Our results seem to indicate that both trypanosomes can impose costs on their invertebrate hosts, depending in part on the environmental conditions governing their interaction. Several studies have shown negative effects of parasitism on vector hosts in a other insect models: *Plasmodium* spp. vs *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes [12,48], Dengue virus vs *Aedes* mosquitoes [49,50] and *Leishmania* spp. vs sand flies [51,52]. In order to measure the impact of parasite infections authors have evaluated parameters such as

blood feeding capacity, duration of development, adult longevity, fecundity, fertility and mating performance. Moreover, effects of *T. cruzi* infection on triatomine fitness have been studied in *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) [23] and *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 [22], both reared around 30°C. In the first study, infected *P. megistus* presented a significant decrease both in their fecundity and fertility [23]. Conversely, infected *T. brasiliensis* showed no significant effects on these parameters [22]. While the first insect species normally prefers temperatures lower than those at which infection effects on adult fitness were evaluated, *T. brasiliensis* prefer temperatures around 30°C and might be better adapted to deal with trypanosome infection at this temperature. Interestingly, the population growth rate of *T. cruzi* culture epimastigotes is affected by ambient temperature [unpublished data], being twice as fast at 30°C than at 27°C. Based on this, these parasites may achieve massive populations at higher temperatures if their access to nutrients is not restricted in the vector gut. In such a scenario, insects would probably lose a large amount of nutritional resources to the parasite population. Moreover, immunological responses to control parasite development would impose an additional energetic cost [10,53]. Comparison of our results and those of previous reports seem to suggest that the environmental temperature at which insects were reared, as well as their adult age, have an impact in the outcome of triatomine-trypanosome interactions.

We have shown that infection by *T. cruzi* does not affect the time taken to initiate oviposition by *R. prolixus* pairs. This seems to be in agreement with a previous study [22] using *T. brasiliensis*. In our experiments, the temperature at which infected *R. prolixus* bugs were held did not have an impact on the pre-oviposition time shown as adults. Nevertheless, infection by *T. rangeli* significantly delayed the onset of oviposition by *R. prolixus* females, showing a cost in terms of reproductive capacity.

An unexpected result was the increase in the e-value of *T. cruzi*-infected insects held at 25°C. This effect was restricted to the second feeding cycle and for these insects, hatching rates were not affected by insect age, but were increased in the infected insects. At present, we can only speculate on the causes of this phenomenon but it might be an interesting topic to investigate further, especially given the possibility of environment-dependent costs of infection and even that costs become benefits under some situations. The phenomenon demonstrated here on *T. cruzi*-infected insects at

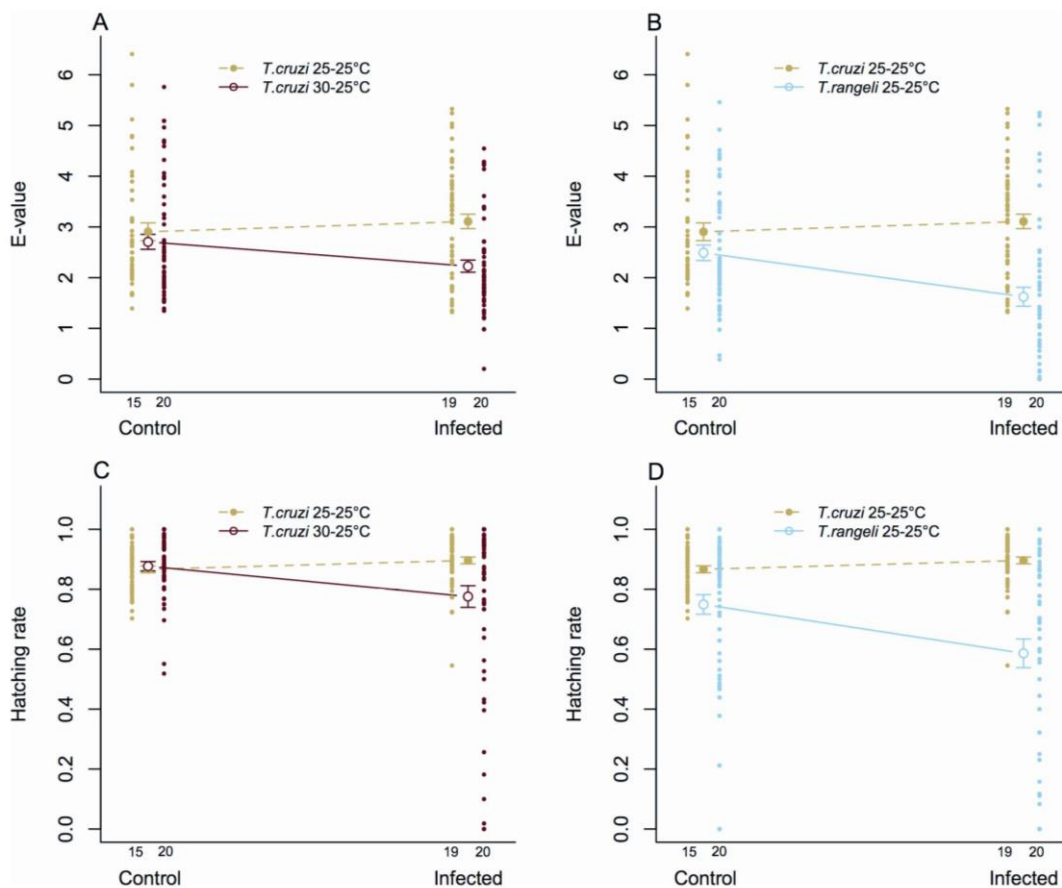


Figure 4. Comparison of the effect of trypanosome infection on e-value and egg hatching rate of *R. prolixus*. A) Variation of e-value between insects exposed to infection by *T. cruzi* 25–25°C and *T. cruzi* 30–25°C and their corresponding controls; B) variation of e-value between insects exposed to infection by *T. cruzi* 25–25°C and *T. rangeli* 25–25°C and their corresponding controls; C) variation of egg hatching rate between insects exposed to infection by *T. cruzi* 25–25°C and *T. cruzi* 30–25°C and their corresponding controls; D) variation of egg hatching rate between insects exposed to infection by *T. cruzi* 25–25°C and *T. rangeli* 25–25°C and their corresponding controls. Data represent the mean \pm s.e. of 15 control and 19 *T. cruzi* 25–25°C infected pairs (A–D), 20 control and 20 *T. cruzi* 30–25°C infected pairs (A and C) and 20 control and 20 *T. rangeli* 25–25°C infected pairs (B and D). Green indicates data obtained from insects infected by *T. cruzi* 25–25°C and controls (A–D), red indicates data from insects infected by *T. cruzi* 30–25°C and controls (A and C) and blue indicates data from insects infected by *T. rangeli* 25–25°C and controls (B and D). Dots represent e-value and hatching rates shown by each pair. doi:10.1371/journal.pone.0105255.g004

25°C has a profile similar to the hormesis reaction, characterized by a reversal of response between low and high doses of a stressor [see review 54].

The negative effects observed on *T. cruzi*-infected insects reared at 30°C may be the consequence of a higher parasite load affecting adult bug energetic balance. In fact, insects exposed to this treatment presented significant decreases in their e-value and the hatching rates of their eggs. The fact that the decrease in e-value was observed during the first reproductive cycle reinforces the idea of negative effects being triggered due to large parasite populations competing for nutrients with bugs. Insects were transferred to 25°C after imaginal molt to avoid inducing a reduction in their nutritional resources due to an increased metabolic rate at higher temperatures. In this way, the probably large parasite populations

they bore might have impacted their nutritional resources, promoting the negative effects observed on e-value. In the next cycles, a combination of lower temperature (slowing parasite growth) and cyclic starvation (decreasing available resources) might have decreased parasite populations bringing them under a threshold where reproductive performance is not affected. However, even if *T. cruzi*-infected insects managed to maintain fecundity parameters similar to those of uninfected insects during the last two cycles studied, the quality of their eggs was significantly affected by infection as shown by their diminished hatching rates. Moreover, this reproductive parameter was affected by insect age, as the proportion of viable offspring decreased as pairs became older. This decreased reproductive performance of *T. cruzi*-infected insects exposed to higher

temperatures might be a consequence of direct competition for energetic resources that could otherwise be used for reproduction [55], an outcome of committing extra resources to implementing immune responses [56] or a result of host manipulation by parasites that reduce host investments in fecundity and prolong parasite survival [55]. To our knowledge, this is the first time that the *e*-value was used to evaluate the impact of trypanosome infection on triatomines.

Infection by *T. rangeli* affected all reproductive parameters evaluated in the present study. As mentioned above, infected pairs showed delayed pre-oviposition times and both their *e*-values and hatching rates were significantly decreased. Moreover, these negative effects increased with insect age. The virulence of *T. rangeli* to triatomines has been broadly described and shown to vary according to parasite strain and experimental methodologies [57]. However, effects of *T. rangeli* on the reproductive performance of triatomines have not been shown to date. In this sense, our results show an additional negative effect that *T. rangeli* can cause to its insect vector. Differently from *T. cruzi*, that develops exclusively in the intestinal tract of bugs, parasites of this species can cross the intestinal epithelium and continue their development in the hemocoel and salivary glands. As the eggs of these insects need abundant energy reserves, females undergo an intense mobilization of lipids, proteins and carbohydrates during oogenesis [58,59]. In *R. prolixus* females, lipids are transported from the fat body to the ovaries by a lipoprotein called lipophorin, to allow their incorporation by oocytes [60,61]. As trypanosomes lack the complete synthesis pathways for some fundamental lipids they must obtain these from their hosts [62–65]. *Trypanosoma rangeli* epimastigotes incorporate lipids together with lipophorin from the host hemolymph [66], probably decreasing the amount of these protein carriers available to the host. In addition, infection by *T. rangeli* can result in large parasite populations found in both the intestine and hemolymph [9]. This could also decrease insect nutritional resources and impact fecundity and fertility. It is important to highlight that pairs were allowed to copulate *ad libitum* in all treatments, even though we did not control whether uninfected insects copulated more frequently than infected ones. It is known that a greater mating frequency improves the fecundity

shown by triatomine pairs [67,68] and the possibility of consequences of trypanosome infection on bug mating performance deserves to be analyzed in further studies.

Conclusions

The reproductive performance of *R. prolixus*, a key vector for Chagas disease transmission to humans, has been shown here to diminish due to trypanosome infection. This can reduce the insect's fitness and therefore exert selective pressures on their interaction with the parasites. It is still not clear whether infection induced a decrease in the reproductive performance of males, females or both, since we have not performed assays to check this possibility, i.e., tests with pairs of infected females mating with control males or infected males with control females. We suggest that much of the selective pressures may be manifested in behavioral effects – infected insects may select a thermal environment that ameliorates negative effects of the parasites, for example, and it is quite possible that mate choice is affected by infection status. It would also be interesting to investigate the fitness of the offspring of infected parents and other subtle, yet ecologically (and therefore epidemiologically) relevant, aspects of these vector-parasite interactions. As mentioned above, we have recently determined that trypanosome-triatomine interactions are drastically affected by environmental temperature, showing that parasite pathogenicity is modulated by this parameter (unpublished data). This might suggest that other known stressors such as starvation and low water vapor pressure may expose insects to conditions inducing significant pathogenicity by these parasites.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Thiago A. Belinato for helpful suggestions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRF AAG MGL SLE. Performed the experiments: MRF. Analyzed the data: DC MRF AAG. Contributed to the writing of the manuscript: MRF AAG MGL SLE DC. Revised critically: MRF AAG MGL SLE DC.

References

- Schofield CJ (1994) Triatominae: Biology and Control. United Kingdom, West Sussex: Eurocommunica Publications. 76p.
- WHO - World Health Organization (2014) Chagas disease (American trypanosomiasis). Geneva: Fact sheet 340. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Accessed 2014 May 22.
- Lent H, Wigodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. Bull Am Mus Nat Hist 163: 127–520.
- Schofield CJ, Galvão C (2009) Classification, evolution and species groups within the Triatominae. Acta Trop 110: 88–100.
- Hashimoto K, Schofield CJ (2012) Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. Parasit Vectors 5: 45.
- Alchain D, Leray D, Fruit J, Capron A (1979) Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. J Parasitol 65: 507–514.
- O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodriguez MB (1994) Comparison of chagasic and non-chagasic myocardial pathologies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Acta Trop 56: 265–287.
- Moraes MH, Guarneri AA, Girardi FP, Rodrigues JB, Eger I, et al. (2008) Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. Parasit Vectors 1: 20.
- D' Alessandro A (1976) The biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: Lumsden WHM, Evans DA, editors. Biology of Kinetoplastida. London: Academic Press, pp. 327–403.
- Cheon HM, Shin SW, Bian G, Park JH, Raikhel AS (2006) Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. J Biol Chem 281: 8426–8435.
- Botto-Mahan C, Ossa CG, Medel R (2008) Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. Physiol Entomol 33: 25–30.
- Ferguson HM, Read AF (2002) Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? Trends Parasitol 18: 256–261.
- Elliot SL, Adler FR, Sabelis MW (2003) How virulent should a parasite be to its vector? Ecology 84: 2568–2574.
- Lambrechts L, Scott TW (2009) Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. Proc R Soc Lond B 276: 1369–1378.
- Ferreira LL, Lorenzo MG, Elliot SL, Guarneri AA (2010) A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. J Invertebr Pathol 105: 91–97.
- Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R (2013) Age-Dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feeding Behavior, Survival, Oviposition Success and Fecundity. PLoS One 8: 3e59933. doi: 10.1371/journal.pone.0059933.
- Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelder JC (1970) Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). II. Life span of adults and fecundity and fertility of females. J Med Entomol 7: 462–469.
- Schaub GA (1988) Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Med Hyg 82: 94–97.
- Kollien AH, Schmidt J, Schaub GA (1998) Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. Acta Trop 70: 127–141.
- Eichler S, Schaub GA (2002) Development of symbionts in Triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. Exp Parasitol 100: 17–27.
- Neves DP, Peres RB (1975) Aspectos da biologia de *Rhodnius prolixus* quando alimentado em animais sadios ou infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Biol 35: 317–320.

22. Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Gomes TF, Sarquis O, Sposina R, et al. (2010) Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 1057–1060.
23. Lima MM, Pereira JB, Santos JAA, Pinto ZT, Braga MV (1992) Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. Ann Entomol Soc Am 85: 458–461.
24. Nouvellet P, Dumonteil E, Goubière S (2011) Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatan peninsula, Mexico. Infect Genet Evol 11(6): 1243–1249.
25. Ramirez-Sierra MJ, Herrera-Aguilar M, Goubière S, Dumonteil E (2010). Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. Trop Med Int Health 15: 77–86.
26. Brecher G, Wigglesworth VB (1944) The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology 35: 220–224.
27. Grewal MS (1957) Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, in the invertebrate host. Exp Parasitol 6: 123–130.
28. Lake P, Friend WG (1967) A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). J Entomol Soc Ont 98: 53–57.
29. Tobie EJ (1970) Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. J Invertebr Pathol 15: 118–125.
30. Eichler S, Schaub GA (1998) The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blasotritohidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 44: 131–140.
31. Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P (2012) Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. Parasit Vectors 5: 105.
32. Tobie EJ (1965) Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. J Parasitol 51: 837–841.
33. Añez N, East JS (1984) Studies in *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effects on the feeding behavior in triatomine bugs. Acta Trop 41: 93–95.
34. Añez N (1984) Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII. Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 249–255.
35. Watkins R (1971) Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. J Invertebr Pathol 17: 59–66.
36. Brenner Z, Chiari E (1963) Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo 5: 220–224.
37. Schottelius J (1987) Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Trop Med Parasitol 38: 323–327.
38. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 1051–1054.
39. Schaub GA, Böker CA (1986) Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. Acta Trop 43: 349–354.
40. Kollien AH, Schaub GA (1998) The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of starvation. J Euk Microbiol 45: 59–63.
41. Davey KG (1987) Inputs to the hormonal control of eggs development in *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 82: 103–108.
42. Guarneri AA, Pereira MH, Diotaiti L (2000) Influence of the Blood Meal Source on the Development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). J Med Entomol 37: 373–379.
43. R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available: <http://www.R-project.org/>.
44. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2013) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.0–5. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
45. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team (2013) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1–113. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
46. De Rosario-Martinez H (2013) phia: Post-Hoc Interaction Analysis. R package version 0.1–5; 2013. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=phia>.
47. Schilman PE, Lazzari CR (2004) Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences. Acta Trop 90: 115–122.
48. Araujo RV, Maciel C, Hartfelder K, Capurro ML (2011) Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. J Insect Physiol 57: 265–273.
49. Grimstad PR, Ross QE, Craig GB Jr (1980) *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) infection. J Med Entomol 17: 1–7.
50. Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, et al. (2011) Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. PLoS One 6: 1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0060878.
51. Schlein Y, Jacobson RL, Messer G (1992) *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and impede parasite transmission by bite. P Natl Acad Sci USA 89: 9944–9948.
52. Rogers ME, Bates PA (2007) *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathog 3: 818–825.
53. Dettloff M, Wittwer D, Weise C, Wiesner A (2001) Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. Cell Tissue Res 306: 449–458.
54. Guedes RNC, Cutler GC (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. Pest Management Science 70: 690–697.
55. Hurd H (2001) Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? Trends Parasitol 17: 363–368.
56. Hurd H (1990) Physiological and behavioural interactions between parasites and invertebrate hosts. Adv Parasitol 29: 271–318.
57. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, de Sánchez N (1986) Laboratory maintenance of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Rev Biol Trop 34: 75–81.
58. Valle D (1995) Vitellogenesis in insects and other group – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 1–26.
59. Atella GC, Gondim KC, Machado EA, Medeiros MN, Silva-Neto MA, et al. (2005) Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. An Acad Bras Cienc 77: 405–430.
60. Gondim KC, Oliveira PL, Masuda H (1989) Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. J Insect Physiol 35: 19–27.
61. Machado EA, Atella GC, Gondim KC, de Souza W, Masuda H (1996) Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. Arch Insect Biochem Physiol 31: 185–196.
62. Coppens I, Courtoy PJ (1995) Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 73: 179–188.
63. Coppens I, Levade T, Courtoy PJ (1995) Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. J Biol Chem 270: 5736–5741.
64. Paul KS, Jiang D, Morita YS, Englund PT (2003) Fatty acid synthesis in African trypanosomes: a solution to the myristate mystery. Trends Parasitol 8: 381–387.
65. Vial HJ, Eklind P, Tielens AG, Van Hellemond, JJ (2003) Phospholipids in parasitic protozoa. Mol Biochem Parasitol 126: 143–154.
66. Folly E, Cunha e Silva NL, Lopes AH, Silva-Neto MA, Atella GC (2003) *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. Biochem Biophys Res Commun 310: 555–561.
67. Asin S, Crocco de Ayerbe LB (1992) Influence of mating on ovarian follicle development in *Triatoma infestans* (Klug, 1834). Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 369–374.
68. Dallon-Teixeira NF, Carvalho-Costa FA, Chiang RG, Lima MM (2009) Influence of blood meal and mating in reproduction patterns of *Triatoma brasiliensis* females (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 1031–1034.

8 REFERÊNCIAS

- Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo NO, Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, Monteiro FA 2013. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 92-99.
- Adamo SA, Jensen M, Younger M 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour* 62: 417-425.
- Afchain D, Leray D, Fruit J, Capron A 1979. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. *Journal of Parasitology* 65: 507-514.
- Amino R, Martins RM, Procopio J, Hirata IY, Juliano, MA, Schenkman S 2002. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 277: 6207-6213.
- Ampleford E 1985. Ecdysteroids influence the circadian system timing ecdysis in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Physiology A* 157: 699-704.
- Ampleford E, Davey K 1989. Egg laying in the insect *Rhodnius prolixus* is timed in a circadian fashion. *Journal of Insect Physiology* 85: 183-187.
- Añez N 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII. Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 249-255.
- Anez N, East JS 1984. Studies in *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effects on the feeding behavior in triatomine bugs. *Acta Tropica* 41: 93-95.
- Añez N, Nieves E, Cazorla D 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 1-6.
- Araujo RV, Maciel C, Hartfelder K, Capurro ML 2011. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. *Journal of Insect Physiology* 57: 265-273.

Ardia DR, Gantz JE, Schneider BC, Strebel S 2012. Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology* 26: 732-739.

Asin S, Crocco de Ayerbe LB 1992. Influence of mating on ovarian follicle development in *Triatoma infestans* (Klug, 1834). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87: 369-374.

Atella GC, Gondim KC, Machado EA, Medeiros MN, Silva-Neto MA, Masuda H 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 405-30.

Baines S 1956. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *The Journal of Experimental Biology* 33: 533-541.

Baldwin WF, Knight AG, Lyn KR 1971. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Entomologist* 10: 18-22.

Barbosa PRB 2006. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology* 112: 132-133.

Barbour JD, Lacey ES, Hanks LM 2007. Cuticular hydrocarbons mediate mate recognition in a species of longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) of the primitive subfamily Prioninae. *Annals of the Entomological Society of America* 100: 333-338.

Barretto MP, Ribeiro RD, Belda Neto FM 1978. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXVIII: Infecção de mamíferos pela via oral. *Revista Brasileira de Biologia* 38: 455-459.

Barrett TB 1988. Current research on Amazonian Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 441-447.

Barrozo R, Lazzari CR 2003. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Journal of Insect Physiology* 49: 315-21.

Barrozo R, Lazzari CR 2004a. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology* 50: 249-54.

- Barrozo R, Lazzari CR 2004b. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses* 29: 319-329.
- Barrozo R, Lazzari CR 2004c. Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses* 29: 833-41.
- Barrozo RB, Lazzari CR 2006. Orientation response of haematophagous bugs to CO₂: the effect of the temporal structure of the stimulus. *Journal of Comparative Physiology A - Neuroethol sensory, neural and behavioral physiology* 192: 827-31.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S 2013. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.0-5. Disponível em <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Belliure B, Janssen A, Maris PC, Peters D, Sabelis MW 2005. Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecology Letters* 8: 70-79.
- Botto-Mahan C, Cattán PE, Medel R 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Tropica* 98: 219-223.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brasileiro VLF 1982. Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera - Reduviidae). I- Influência da cópula e da longevidade. *Revista Brasileira de Biologia* 42: 1-13.
- Brecher G, Wigglesworth VB 1944. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology* 35: 220-224.
- Brener Z 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology* 27: 347-382.
- Brener Z, Andrade A, Barral-Netto M 2000. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2ªEd. Guanabara Koogan RJ. 431p.

- Brener Z, Chiari E 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 5: 220-224.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30: 35-44.
- Buxton PA 1930. Biology of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Transactions of Entomological Society of London* 78: 227-236.
- Calvo Mendez ML, Nogueira Torres B, Alejandro Aguilar R 1992. The oral route: an access port for *Trypanosoma cruzi*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 34: 39-42.
- Canavoso LE, Stariolo R, Rubiolo ER 2003. Flight metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the role of carbohydrates and lipids. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 909-914.
- Candy DJ, Becker A, Wegener G 1997. Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117B: 497-512.
- Carbajal de la Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo MG 2007. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica* 101: 115-119.
- Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estnai S, Russomando G, Luquetti A, Frelj H, Albajar Vinas P 2011. Congenital chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Disease* 5: e1250 doi:10.1371/journal.pntd.0001250.
- Ceballos LA, Vazquez-Prokopec GM, Cecere MC, Marcet PL, Gurtler RE 2005. Feeding rates nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Tropica* 95: 149-59.
- Chagas C 1909. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., m. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

- Chapman RF 2013. *The insects: Structure and Function*. 5th edition. Cambridge University Press, UK. 929p.
- Chapman T, Liddle LF, Kalb JM, Wolfner MF, Partridge L 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373: 241-244.
- Cheon HM, Shin SW, Bian G, Park JH, Raikhel AS 2006. Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 8426-35.
- Cocchiararo-Bastias LM, Mijailovsky SJ, Calderon-Fernández GM, Lorenzo Figueiras AN, Juárez MP 2011. Epicuticle Lipids Mediate Mate Recognition in *Triatoma infestans*. *Journal of Chemical Ecology* 37: 246-252.
- Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 113-122.
- Coura JR, Borges-Pereira J 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115: 5-13.
- Coura JR, Dias JC 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 31-40.
- Crespo JG, Manrique G 2007. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal gland. *Journal of Insect Physiology* 53: 708-714.
- Cuba Cuba A 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31: 207-220.
- D' Alessandro A 1976. The biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: Lumsden WHM, Evans DA. Eds. *Biology of Kinetoplastida*. v.1, London, p. 327-403.
- D'Alessandro A, Mandel S 1969. Natural infections and behaviour of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *Journal of Parasitology* 54: 846-852.
- D'Alessandro-Bacigalupo A, Saraiva NG 1992. *Trypanosoma rangeli*. In: Kreir J.P. & Baker J. Eds. *Parasitic Protozoa*. v. 2, Academic Press, London, p. 1-54.

- Daflon-Teixeira NF, Carvalho-Costa FA, Chiang RG, Lima MM 2009. Influence of blood meal and mating in reproduction patterns of *Triatoma brasiliensis* females (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 1031-1034.
- Davey 1967. Some consequences of copulation in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 13: 1629-1636.
- Davey K 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 53: 208-215.
- Davey KG 1987. Inputs to the hormonal control of eggs development in *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 103-108.
- De Loof A 2011. Longevity and aging in insects: Is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the “trade-off” concept *Journal of Insect Physiology* 57: 1-11.
- De Rosario-Martinez H: phia 2013. Post-Hoc Interaction Analysis. R package version 0.1-5. Disponível em <http://CRAN.R-project.org/package=phia>.
- Dettloff M, Wittwer D, Weise C, Wiesner A 2001. Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell and Tissue Research* 306: 449-458.
- Dias E, Laranja FS, Nobrega G 1945. Doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 43: 495-581.
- Dias JCP 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today* 3: 336-341.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Dujardin JP, Muñoz M, Chavez T, Ponce C, Moreno J, Schofield CJ 1998. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 113-115.
- Edwards JS 1998. Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. *The International Journal of Developmental Biology* 42: 471-473.

- Eger-Mangrich I, Oliveira MA, Grisard EC, Souza W, Steindel M 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. *Parasitology Research* 87: 505-509.
- Eichler S, Schaub GA 1998. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology* 44: 131-140.
- Eichler S, Schaub GA 2002. Development of symbionts in Triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology* 100: 17-27.
- Elliot SL, Adler FR, Sabelis MW 2003. How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology* 84: 2568-2574.
- Feder D, Gomes SAO, Garcia ES, Azambuja P 1999. Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 771-777.
- Ferguson HM, Read AF 2002. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends in Parasitology* 18: 256-261.
- Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbel DA, Zingales B, Coura JR 1999. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 195-197.
- Ferreira LL, Lorenzo MG, Elliot SL, Guarneri AA 2010. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 105: 91-97.
- Ferreira RA, Lazzari CR, Lorenzo MG, Pereira MC 2007. Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels. *Plos One* 2(9): e932 doi:10.1371/journal.pone.0000932.
- Ferreira RC 2014. Avaliação da colonização por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*. Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas). *Dissertação de Mestrado*. 111p.

- Ferveur JF, Cobb M, Boukella H, Jallon JM 1996. World-wide variation in *Drosophila melanogaster* sex pheromone: behavioural effects, genetic bases and potential evolutionary consequences. *Genetica* 97: 73-80.
- Figueiredo MB, Genta FA, Garcia ES, Azambuja P 2008. Lipid mediators and vector infection: *Trypanosoma rangeli* inhibits *Rhodnius prolixus* hemocytes phagocytosis by modulation of phospholipase A2 and PAFacetylhydrolase activities. *Journal of Insect Physiology* 54: 1528-1537.
- Flores G, Lazzari CR 1996. The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. *Journal of Insect Physiology* 42: 433-440.
- Fowler K, Partridge L 1989. A cost of mating in female fruitflies. *Nature* 338: 760-761.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ 2006. Ancestral gnomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathogens* 2: 226-235 doi: 10.1371/journal.ppat.0020024.
- French SS, Johnston GIH, Moore MC 2007. Immune activity suppresses reproduction in food-limited female tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Functional Ecology* 21: 1115-1122.
- Fresquet N, Lazzari CR 2011. Response to heat in *Rhodnius prolixus*: The role of the thermal background. *Journal of Insect Physiology* 57: 1446-1449.
- Friberg U 2006. Male perception of female mating status: its effect on copulation duration, sperm defence and female fitness. *Animal Behaviour* 72: 1259-1268.
- Friend WG, Smith JJB 1985. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *Journal of Insect Physiology* 17: 233-243.
- Gage AR, Barnard CJ 1996. Male crickets increase sperm number in relation to competition and female size. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 38: 349-353.
- Galvão C, Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo R 2001. Início da atividade de vôo em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carvallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 137-140.

- Gamboa CJ 1963. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliarios en Venezuela (Comunicación preliminar). *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 54: 18-25.
- Garcia ES, Azambuja P 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today* 7: 240-244.
- Garcia ES, Machado EMM, Azambuja P 2004. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology* 107: 31-38.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JMC 1994. *Rhodnius prolixus* salivary anti-hemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Experimental Parasitology* 78: 287-293.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology* 53: 11-21.
- García-Pérez J, Blanco-Pinon A, Navarro-Fernandez E 1997. Comportamiento sexual de *Triatoma gerstaeckeri* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Zoologica Mexicana* 70: 55-63.
- Garnham PCC 1980. The significance of inapparent infections in Chagas` disease and other forms of trypanosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 75: 181-188.
- Gaunt M, Miles M 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 557-565.
- Gomes SAO, Feder D, Garcia ES, Azambuja P 2003. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology* 49: 829-837.
- Gomes SAO, Feder D, Thomas NES, Garcia ES, Azambuja P 1999. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: in vivo and in vitro experiments. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 289-293.
- Gomes SAO, Graciano GL, Nogueira NFS, Souza W, Garcia ES, Azambuja P 2002. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 86-92.

- Gomez I 1967. Nuevas observaciones acerca de la acción patógena del *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 sobre *Rhodnius prolixus* Stål, 1859. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 91: 5-10.
- Gonçalves TC, Teves-Neves SC, dos Santos-Mallet JR, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 429-37.
- González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 142: 1-16.
- Gregorio EA, Ratcliffe NA 1991a. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 181-186.
- Gregorio EA, Ratcliffe NA 1991b. The prophenoloxidase system and *in vitro* interaction of *Trypanosoma rangeli* with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* haemolymph. *Parasite Immunology* 13: 551-564.
- Grewal MS 1957. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, in the Invertebrate host. *Experimental parasitology* 6: 123-130.
- Gringorten J, Friend W 1979a. Wing-beat pattern in *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae) during exhaustive flight. *Canadian Journal of Zoology* 57: 391-395.
- Gringorten JL, Friend WG 1979b. Tissue development in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Dry-weight changes in fed and unfed post-ecdysial males. *The Canadian Entomologist* 111: 735-740.
- Grimstad PR, Ross QE, Craig GB Jr. 1980 *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) infection. *Journal of Medical Entomology* 17: 1-7.
- Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, Romanha AJ 1999. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central e South America: an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 203-209.
- Guarneri AA, Lazzari C, Diotaiuti L, Lorenzo M 2002a. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology* 27: 142-147.

- Guarneri AA, Lazzari C, Xavier AAP, Diotaiuti L, Lorenzo M 2003. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology* 28: 185-191.
- Guarneri AA, Pereira MH, Diotaiuti L 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 37: 373-379.
- Guedes RNC, Cutler GC 2013. Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science* 70: 690-697.
- Guhl F 1990. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 531-532.
- Guhl F 2001. Métodos parasitológicos. In: *Guhl F, Nicholls S Eds. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas*, Ediciones Uniandes, Bogotá, Colombia. 20-24 p.
- Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94: 475-484.
- Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA 2002. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Archives of Medical Research* 33: 362-370.
- Guinnee MA, Moore J 2004. The effect of parasitism on host fecundity is dependent on temperature in a cockroach- acanthocephalan system. *The Journal of Parasitology* 90: 673-677.
- Gullan PJ, Cranston PS 2008. Sistemas sensoriais e comportamento. In: *Gullan PJ & Cranston PS Eds. Os insetos - Um resumo de Entomologia*. 3ª ed. Ed. Roca, São Paulo. 75-98p.
- Gürtler RE, Kitron U, Cecere MC, Segura EL, Cohen JE 2007. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy of Science* 104: 16194-16199.

- Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging Infectious Disease* 9: 29-32.
- Hamilton WD 1964a. The genetical evolution of social behavior. I. *Journal of Theoretical Biology* 7: 1-16.
- Hamilton WD 1964b. The genetical evolution of social behavior. II. *Journal of Theoretical Biology* 7: 17-52.
- Harrington JS 1960. Studies on *Rhodnius prolixus*: Growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology* 50: 279-286.
- Hashimoto K, Schofield CJ 2012. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites & Vectors* 45: 1-17.
- Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W 1990. Development and interaction of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitology Research* 76: 311-318.
- Higushi ML 1999. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasites antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 263-267.
- Hoare C, Wallace FG 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212: 1385-1386.
- Hogg JC, Carwardine S, Hurd H 1997. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on ovarian protein accumulation by *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research* 83: 374-379.
- Howard RW, Blomquist GJ 2005. Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50: 371-393.
- Hudson L, Guhl F, Sanches N, Bridge D, Jaramillo CA, Young A 1988. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 96: 449-460.
- Hurd H 1990. Physiological and behavioural interactions between parasites and invertebrate hosts. *Advances in Parasitology* 29: 271-318.

- Hurd H 2001. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trend in Parasitology* 17: 363-368.
- Hurd H 2005. Parasite manipulation: stretching the concepts. *Behavioural Processes* 68: 235-236.
- Hurd H 2011. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48: 141-161.
- Ianora A, Mazzocchi MG, Scotto di Carlo B 1987. Impact of parasitism and intersexuality on Mediterranean populations of *Paracalanus parvus* (Copepoda: Calanoida). *Diseases of Aquatic Organisms* 3: 29-36.
- Juarez E 1970. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Revista de Saúde Pública* 4: 147-166.
- Jurberg J, Cunha, V, Cailleaux S, Raigorodski R, Lima MS, Rocha DS & Moreira FFF 2013. *Triatoma pintodiasi* sp.nov. of the *T. rubrovaria* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Pan-Amazônica de Saude*: 4 43-56.
- Jutsun AR, Goldsworthy GJ 1974. Some effects of mermithid infection on metabolic reserves and flight in *Locusta*. *International Journal for Parasitology* 4: 625-630.
- Katvala M, Kaitala A 2001. Male choice for current egg fecundity in a polyandrous egg-carrying bug. *Animal Behaviour* 62: 133-137.
- Khan I, Prasad NG 2013. Male *Drosophila melanogaster* show adaptive mating bias in response to female infection status. *Journal of Insect Physiology* 59: 1017-1023.
- Kollien AH, Schmidt J, Schaub GA 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* 70: 127-141.
- Lake P, Friend WG 1967. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* 98: 53-57.
- Lazzari CR 1992. Circadian organisation of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology* 38: 895-903.

- Lazzari CR 2009. Orientation towards hosts in haematophagous insects: an integrative perspective. *Advances in Insect Physiology* 37: 1-58.
- Lazzari CR, Núñez JA 1989. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology* 35: 525-529.
- Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG 2013. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1-14.
- Lee JH, Rowley WA, Platt KB 2000. Longevity and spontaneous flight activity of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) infected with Western equine encephalomyelitis virus. *Journal of Medical Entomology* 37: 187-93.
- Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ 1992. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* 52: 27-38.
- Lehane MJ, Schofield CJ 1976. Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 520-526.
- Lehane MJ, Schofield CJ 1982. Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research* 72: 497-510.
- Lent H, Wygodzinsky M 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- Levine ND, Corlissa JO, Cox EEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM 1994. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37-58.
- Lietze VU, Geden CJ, Blackburn P, Boucias DG 2007. Effects of salivary gland hypertrophy virus on the reproductive behavior of the housefly, *Musca domestica*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6811-6818.
- Lima MM, Jürberg P, Ribeiro de Almeida J 1986. Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81: 1-5.

- Lima MM, Pereira JB, Santos JAA, Pinto ZT, Braga MV 1992. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. *Entomological Society of America* 85: 458-461.
- Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Peixoto AA 2011. Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. *Plos One* 6: 1-5 doi:10.1371/journal.pone.0017690.
- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski AJr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM 2006. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology* 133: 603-611.
- Lorenzo MG, Guarneri AA, Pires HHR, Diotaiuti L, Lazzari CR 2000. *Caderno de Saúde Pública* 16: 69-74.
- Lorenzo MG, Lazzari CR 1998. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica* 70: 163-170.
- Lucena DT, Vergetti JG 1973. Natural infection of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) by *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) in the interior of the State of Alagoas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 15: 171-178.
- Lupold S, Manier MK, Ala-Honkola O, Belote JM, Pitnick S 2011. Male *Drosophila melanogaster* adjust ejaculate size based on female mating status, fecundity and age. *Behavioral Ecology* 22: 184-191.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 1-12.
- Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard, EC, Steindel M 2001. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *International Journal for Parasitology* 31: 632-634.
- Maniania NK, Okech MA, Adino JO, Opere JO, Ekesi S 2013. Transfer of inoculum of *Metarhizium anisopliae* between adult *Glossina morsitans morsitans* and effects of fungal infection on blood feeding and mating behaviors. *Journal of Pest Science* 86: 285-292.

- Manoel-Caetano FS, Silva AE 2007. Biology of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Caderno de Saúde Pública* 23: 2263-2274.
- Manrique G, Lazzari CR 1994. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 629-633.
- Manrique G, Lazzari CR 1995. Existence of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I. Behavioural evidence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 90: 645-648.
- Manrique G, Schilman PE 2000. Two different vibratory signals in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) *Acta Tropica* 77: 271-278.
- Manrique G, Vitta ACR, Ferreira RA, Zani CL, Unelius CR, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2035-2052.
- Marinkelle CF 1968. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature. *Journal of Medical Entomology* 5: 497-499.
- Marlière NP, Rodrigues JO, Ferreira LL, Carrasco D, Lorenzo MG, Guarneri AA 2011. The locomotor activity of *Rhodnius prolixus* is differently affected by infection of *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma rangeli*. In *XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXVIII Annual Meeting on basic research in Chagas' Disease*, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Sociedade Brasileira de Protozoologia. 210p.
- Matthews KR 2011. Controlling and Coordinating Development in Vector-Transmitted Parasites. *Science* 331: 1149-1153.
- May-Concha I, Rojas JC, Cruz-López L, Millar JG, Ramsey JM 2013. Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation. *Medical and Veterinary Entomology* 27: 165-174.
- Mc Ewen PK, Lehane MJ 1993. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Science and its Application* 14: 461-464.

- Mc Ewen PK, Lehane MJ 1994. Relationship between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Applied Entomology* 117: 217-223.
- Mc Ewen PK, Lehane MJ, Whitaker CJ 1993. The effect of adult population density on flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Applied Entomology* 116: 321-325.
- McNeil JN 1991. Behavioral ecology of pheromone mediated communication in moths and its importance in the use of pheromone traps. *Annual Review of Entomology* 36: 407-430.
- Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 261-268.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov A, Alexandrov K, Podlipaev S, Maslov D 2001. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 161-169.
- Minoli AS, Lazzari CR 2006. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Tropica* 97: 324-330.
- Molyneux D 1973. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 67: 371-372.
- Molyneux DH, Jefferies D 1986. Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. *Parasitology* 92: 721-36.
- Moraes MH, Guarneri AA, Girardi FP, Rodrigues JB, Eger I, Tyler KM, Steindel M, Grisard EC 2008. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Parasites & Vectors* 20: 1-10.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K 2004. An update view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1861-1875.

- Nandy B, Joshi A, Ali ZS, Sen S, Prasad NG 2012. Degree of adaptive male mate choice is positively correlated with female quality variance. *Scientific Reports* 2: 447.
- Neves DP, Peres RB 1975. Aspectos da biologia de *Rhodnius prolixus* quando alimentado em animais sadios ou infectados com o *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Biologia* 35: 317-320.
- Noireau F, Abad-Franch F, Valente AS, Dias-Lima A, Lopes CM, Cunha V, Valente VC, Palomeque FS, Carvalho-Pinto CJ, Sherlock I 2002. Trapping Triatominae in silvatic habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 61-63.
- Noireau F, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 1-6.
- Noireau F, Dujardin JP 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 385-389.
- Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S 2011. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatan peninsula, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* 11(6): 1243-1249.
- Núñez JA 1982. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research* 72: 252-262.
- O'daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodriguez MB 1994. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Tropica* 56: 265-287.
- Oliveira MA, Souza W 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology International* 52: 299-307.
- Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Gomes TF, Sarquis O, Sposina R, Lima MM 2010. Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105: 1057-1060.
- Pai A, Yan G 2003. Effects of tapeworm infection on male reproductive success and mating vigor in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Parasitology* 89: 516-21.

- Paim RMM, Pereira MH, Araújo RN, Gontijo NF, Guarneri AA 2013. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophenols in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 229-236.
- Partridge L, Prowse N, Pignatelli P 1999. Another set of responses and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B Biological Science* 266: 255-61.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team 2013. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-113.
- Pinho AP, Gonçalves TCM, Mangia RH, Russell NSN, Jansen AM 1998. The occurrence of *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in the state of Rio de Janeiro, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 141-143.
- Pires HHR, Lazzari CR, Schilman PE, Diotaiuti L, Lorenzo MG 2002. Dynamics of thermopreference in the Chagas disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 39: 716-719.
- Pires HHR, Lorenzo MG, Lazzari CR, Diotaiuti L, Manrique G 2004. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): in an Experimental study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 295-300.
- Pitafi KD, Simpson R, Day T 1995. Male mate choice for fecund females in seaweed flies. *Pakistan Journal of Zoology* 27: 233-240.
- Poinar Jr 2013. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatominein Dominican amber, with evidence of gut flagellates. *Palaeodiversity* 6: 1-8.
- Polak M, Luong LT, Starmer WT 2007. Parasites physically block host copulation: a potent mechanism of parasite-mediated sexual selection. *Behavioral Ecology* 18: 952-957.
- Pontes GB 2010. Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas). *Tese de Doutorado*. 172p.

Pontes GB, Bohman B, Unelius RC, Lorenzo MG 2008. Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Chemical Ecology* 34: 450-457.

Pontes GB, Lorenzo MG 2012. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. *Medical and Veterinary Entomology* 26: 33-36.

Pontes GB, Zacharias CA, Manrique G, Lorenzo MG 2013. Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation. *Medical and Veterinary Entomology* doi: 10.1111/mve.12040.

Poulin R, Fredensborg BL, Hansen E, Leung TLF 2005. The true cost of host manipulation by parasites. *Behavioural Processes* 68: 241-244.

Prata A 1999. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 81-88.

Prata A 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Disease* 1: 92-100.

R Core Team. R 2013. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <http://www.R-project.org/>.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B 2002. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Tropica* 84: 89-98.

Ramirez-Sierra MJ, Herrera-Aguilar M, Gourbière S, Dumonteil E 2010. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine & International Health* 15: 77-86

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

- Reisenman CE, Lazzari CR, Giurfa M 1998. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Comparative Physiology A* 183: 533-541.
- Ridley M 1996. Evolution. Second edition. *Blackwell Science*, Oxford.
- Rodrigues JO 2013. Efeito da temperatura na infecção de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas). *Dissertação de Mestrado*. 99p.
- Rogers ME, Bates PA 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens* 3: 818-825 doi: 10.1371/journal.ppat.0030091.
- Rojas JC, Cruz-López L 1992. Sexual behaviour in two species of *Triatoma phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology* 29: 13-18.
- Rojas JC, Malo EA, Gutierrez-Martinez A, Ondarza RA 1990. Mating behaviour of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Annals of Entomological Society of America* 83: 598-602.
- Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira Filho JCR, de Carvalho EOC, Camargo LMA, de Oliveira J, Nascimento JD, Cilense M, Almeida CE 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62-76.
- Roque ALR, Xavier SCC, Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM 2008. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas Disease outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 742-749.
- Rosengaus RB, James LT, Hartke TR, Brent CS 2011. Mate preference and disease risk in *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Environmental Entomology* 40: 1554-65.
- Sadd BM, Siva-Jothy MT 2006. Self-harm caused by an insect's innate immunity. *Proceedings of the Royal Society London B* 273: 2571-2574.

- Sánchez LV, Ramírez JD 2013. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*: 140(2): 147-59.
- Schal C, Burns E L, Jurenka RA, Blomquist GJ 1990. A new component of the female sex pheromone of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae), and interaction with other pheromone components. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1997-2008.
- Schaub GA 1988a. Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 74: 593-594.
- Schaub GA 1988b. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene* 82: 94-97.
- Schaub GA, Böker CA 1986. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Tropica* 43: 349-354.
- Schilman PE, Lazzari CR 2004. Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences. *Acta Tropica* 90: 115-122.
- Schilman PE, Núñez JA, Lazzari CR 1996. Attributes of oviposition substrates affect fecundity in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 42: 837-841.
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of National Academy of Science USA* 89: 9944-9948.
- Schofield CJ 1979. Demonstration of isobutyric acid in some triatomine bugs. *Acta Tropica* 36: 103-105.
- Schofield CJ 1994. Triatominae: Biology and Control. Ed. *Eurocommunica Publications*. West Sussex, United Kingdom. 76p.
- Schofield CJ, Dujardin JP 1997. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitology Today* 13: 141-144.
- Schofield CJ, Dujardin JP 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actualidades Biológicas (Medellin)* 70: 183-197.

- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110: 88-100.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control *Trends in Parasitology* 22: 583-588.
- Schottelius J 1987. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 38: 323-327.
- Schuster JP, Schaub GA 2000. *Trypanosoma cruzi*: skinpenetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *International Journal of Parasitology* 30: 1475-1479.
- Schweigmann N, Vallve S, Muscio O, Ghillini M, Alberti A, Wisnivesky-Colli C 1988. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Medical and Veterinary Entomology* 2: 401-404.
- Seyoum E, Moore D, Charnley A K 1994. Reduction in flight activity and food consumption by the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskål (Orth., Cyrtacanthacrinae), after infection with *Metarhizium flavoviride* *Journal of Applied Entomology* 118: 310-315.
- Shorey HH 1973. Manipulation of insect pests of agricultural crops. *In: Chemical control of insects behaviour. Theory and application* Eds. Shorey HH, McKelvey JJ. Jhon Wiley & Sons, New York. p. 353-367.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* 22: 168-174.
- Soares AC, Araújo RN, Carvalho-Tavares J, Gontijo Nde F, Pereira MH 2014. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitology International* 63: 229-236.
- Stahlschmidt ZR, Rollinson N, Acker M, Adamo SA 2013. Are all eggs created equal? Food availability and the fitness trade-off between reproduction and immunity. *Functional Ecology* 27: 800-806.
- Stearns SC 1989. Trade-offs in life history evolution. *Functional Ecology* 3: 259-268.
- Steindel M, Carvalho Pinto C, Toma HK, Mangia RH, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*)

in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 73-79.

Svobodová M, Zidková L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votýpka J 2007. *Sergeia podlipaevi* gen. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (2): 423-432.

Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R 2013. Age-Dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feeding Behavior, Survival, Oviposition Success and Fecundity. *PLoS One* 8: 3e59933. doi:10.1371/journal.pone.0059933.

Takle GB 1988. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 64-72.

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

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

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR 2006. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 463-491.

Thomas F, Adamo S, Moore J 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes* 68: 185-199.

Tibayrenc M 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology* 36: 47-115.

Tobie EJ 1965. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Parasitology* 51: 837-841.

Tobie EJ 1970. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 118-125.

- Tomalak M, Michalski J, Grocholski J 1984. The influence of nematodes on the structure of genitalia of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 43: 358-362.
- Tovar D, Urdaneta-Morales S, Tejero F 1989. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: study of the effects of the parasite on the vector. *Acta Científica Venezolana* 40: 208-214.
- Valle D 1993. Vitellogenesis in insects and other group – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 1-26.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica* 72: 203-212.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA 2009. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica* 110: 137-147.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, de Sánchez N 1986. Laboratory maintenance of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. *Revista de Biología Tropical* 34: 75-81.
- Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Kitron U, Gürtler RE 2004. Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. *Journal of Medical Entomology* 41: 614-621.
- Vazquez-Prokopec GM, Spillmann C, Zaidenberg M, Kitron U, Gurtler RE 2009. Cost-effectiveness of Chagas disease vector control strategies in northwestern Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(1): e363 doi:10.1371/journal.pntd.0000363.
- Vézilier J, Nicot A, Gandon S, Rivero A 2012. *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society London B* 279: 4033-4041.
- Vitta ACR 2009. Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae: Triatominae). Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas). *Tese de Doutorado*. 166p.
- Vitta ACR, Lorenzo MG 2009. Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 46: 789-795.

Wallace FG, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I 1983. Guideline for the description of new species of lower trypanosomatids. 30: 308-313.

Ward JP 1981. A comparison of the behavioural response of the haematophagous bug, *Triatoma infestans*, to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n and iso-butyric acid). *Physiology Entomology* 6: 325-329.

Ward JP, Candy DJ, Smith SN 1982. Lipid storage and changes during flight by triatomine bugs (*Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*). *Journal of Insect Physiology* 28: 527-534.

Watkins 1969. "Host-parasite interaction between *Trypanosoma* species and *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Tese de PhD*. Universidade da Califórnia, Berkeley.

Watkins 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Invertebrate Pathology* 17: 59-66.

White JA, Ganter P, McFarland R, Stanton N, Lloyd M 1983. Spontaneous, field tested and tethered flight in healthy and infected *Magicicada septendecim* L. *Oecologia* 57: 281-286.

WHO - World Health Organization 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis). Geneva, *Fact sheet* 340. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Wigglesworth VB 1934. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and "metamorphosis". *Quarterly Journal of Microscopical Science* 77: 191-222.

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

Wigglesworth VB 1939. *The principles of insect physiology*. Methuen, London.

Wigglesworth VB 1950. *The principles of insect physiology*. 4th Edition. Methuen, London.

Wigglesworth VB 1964. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. *Advances in Insect Physiology* 2: 247-336.

Wisnivesky-Colli C, Gürtler RE, Solarz ND, Schweigmann NJ, Pietrokovky SM, Alberti A, Flo J 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 27-32.

- Yanagi S, Miyatake T 2003. Costs of mating and egg production in female *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Insect Physiology* 49: 823-827.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal of Parasitology* 35: 225-233.
- Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E 2007. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 47: 540-544.
- Zacharias CA, Pontes GB, Lorenzo MG, Manrique G 2010. Flight initiation by male *Rhodnius prolixus* is promoted by female odors. *Journal of Chemical Ecology* 36: 449-451.
- Zar JH 1999. Biostatistical analysis. 4ed. New Jersey: *Prentice Hall Inc.* 938 p.
- Zeledón R 2004. Some historical facts and recent issues related to the presence of *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae) in Central America. *Entomologia y Vectores* 11: 233-246.
- Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelde JC 1970. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). II. Life span of adults and fecundity and fertility of females. *Journal of Medical Entomology* 7: 462-469.