



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Avaliação do impacto da infecção por *Trypanosoma rangeli*  
Tejera 1920 sobre o comportamento sexual e reprodutivo de  
fêmeas de *Rhodnius prolixus* Stal 1859.

**Guilherme dos Santos Machado**

Orientador (es): Dr<sup>a</sup> Suzete Araújo Oliveira Gomes

Dr<sup>a</sup> Simone Patrícia Carneiro de Freitas

Rio de Janeiro  
2014

**Avaliação do impacto da infecção por *Trypanosoma rangeli* Tejera  
1920 sobre o comportamento sexual e reprodutivo de fêmeas de  
*Rhodnius prolixus* Stal 1859**

Monografia submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de especialista em  
Entomologia Médica, Curso de Especialização  
em Entomologia Médica, pelo Instituto  
Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Fundação Oswaldo Cruz  
Universidade Federal Fluminense

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Assinatura do Aluno

---

Assinatura do Orientador

---

Assinatura do 2º Orientador

## RESUMO

Os insetos podem ter seu potencial reprodutivo alterado pela competição por nutrientes e danos aos tecidos causados por parasitas. Alguns parasitas podem ainda alterar o comportamento de seus hospedeiros. *Rhodnius prolixus* além de ser o inseto vetor do *Trypanosoma cruzi*, também é hospedeiro de *Trypanosoma rangeli*. Este parasita invade diversos tecidos do hospedeiro invertebrado, provocando diversas alterações fisiológicas, sendo apontado como patogênico para o inseto vetor. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar as possíveis alterações no comportamento sexual e reprodutivo de fêmeas de *R. prolixus* infectadas por *T. rangeli*. Para isto, foi analisado o comportamento de corte, de cópula e de guarda em fêmeas infectadas e não infectadas. A fim de observar as possíveis alterações na fertilidade das fêmeas infectadas, foi analisado a ovipostura de cada fêmea e o número de ninfas eclodidas. O tempo de duração da cópula foi significativamente alterado, enquanto o intervalo pré-cópula e o comportamento de guarda não tiveram seu tempo significativamente alterado pela infecção. Buscando entender se ocorreram alterações nos tecidos reprodutivos, foi realizado um estudo ultraestrutural dos ovários das fêmeas utilizadas no experimento. Nossos resultados demonstraram alterações nos núcleos das células ovarianas, indicando um processo degenerativo, sugestivo de atresia.

**Palavras-chave:** Comportamento sexual, Ovário, ultraestrutura, interação parasita-vetor.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	3
SUMÁRIO .....	4
1.INTRODUÇÃO .....	5
1.1 SISTEMA REPRODUTOR DA FÊMEA.....	6
1.2 COMPORTAMENTO DE CORTE EM INSETOS .....	8
1.3 COMPORTAMENTO SEXUAL .....	9
1.4 COMPORTAMENTO DE GUARDA .....	10
1.5 FECUNDAÇÃO .....	10
1.6 <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	11
2.OBJETIVO GERAL.....	14
2.1OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.METODOLOGIA .....	16
3.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS:.....	16
3.2 MANUTENÇÃO DE <i>Trypanossoma rangeli</i> :.....	16
3.3 INFECCÃO ORAL: .....	17
3.4 COMPORTAMENTO DE CÓPULA:.....	18
4. RESULTADOS .....	21
4.1 DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL E REPRODUTIVO DE <i>Rhodnius prolixus</i> .....	21
PERÍODO DE PRÉ-CÓPULA (CORTE): .....	21
4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE OVÁRIO DE FÊMEAS DE <i>R. prolixus</i> .....	29
5. DISCUSSÃO .....	31
6. CONCLUSÕES.....	35
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## 1.INTRODUÇÃO

Os insetos de uma forma geral são seres dióicos com reprodução sexuada. Em sua maioria, machos e fêmeas sexualmente maduros devem estar presentes no mesmo local ao mesmo tempo, para que, através do acasalamento, ocorra transferência de espermatozoides às fêmeas possibilitando a fecundação dos ovócitos (GULLAN e CRANSTON, 2005). Entretanto, os representantes de algumas ordens, como as abelhas em Himenóptera, podem apresentar a reprodução assexuada (SNODGRASS, 1935).

Para que os insetos completem seu ciclo de vida, é necessária uma sincronização dos comportamentos e condições reprodutivas (MATTHEWS e MATTHEWS, 2010). Além disso, a reprodução depende, não só do monitoramento de estímulos fisiológicos, como também de um sistema neuroendócrino que desempenha um papel regulador (GULLAN e CRANSTON, 2005). Neste contexto, o comportamento sexual é parte importante para compreensão da biologia das espécies, uma vez que o isolamento etológico pode ser apontado como barreira para o fluxo gênico entre espécies simpátricas (FUTUYAMA, 2009).

Uma vez que a maioria dos insetos se reproduz de maneira sexuada, muitas espécies desenvolveram mecanismos que medeiam o encontro entre sexos. Dentre os tipos de comportamentos sexuais, estão descritos na literatura a produção de som, com utilização de aparelho estridulatório (ROSADO-NETO e SANTOS, 2010); a vibração de asas (VIRANT-DOBERLET, e COKL, 2004); a liberação de feromônios (SHOREY, 1973) e sinais visuais através de uma série de movimentos táteis e corporais (CHAPMAN, 2013).

Os parasitas podem alterar o comportamento do hospedeiro como forma de aumentar suas chances de sucesso para completar o seu ciclo de vida ou a alteração comportamental pode ser apenas uma tentativa do hospedeiro de eliminar o parasita (LEWIS et al., 2002). Essas alterações podem interferir no sucesso reprodutivo do inseto hospedeiro, causando uma diminuição nos recursos direcionados à reprodução, sendo considerada uma estratégia para melhor convivência do hospedeiro com o parasita (HURD, 1998). Em alguns casos, a redução do sucesso reprodutivo pode ser apenas uma resposta aos danos causados pelo parasita ao sistema do hospedeiro. Embora, no caso de interação do *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 com o parasita *Hymenolepis diminuta* Rudolphi, 1819, ocorra o aumento no valor do presente nupcial

do macho que acaba por gerar um aumento no número de larvas eclodidas, demonstrando um aumento em vez de queda no potencial reprodutivo (HURD e ARDIN, 2003).

Os insetos podem ter seu potencial reprodutivo alterado pela competição por nutrientes e danos aos tecidos causados por parasitas. Exemplos na literatura demonstram a relação da borboleta monarca com o protozoário *Ophryocystis elektroscirrha* McLaughlin & Myers, 1970, no qual o inseto tem a saúde, morfologia, tamanho do adulto e sucesso reprodutivo dos machos afetados, sendo o dano diretamente relacionado à carga parasitária recebida por cada inseto (ALTIZER e OBERHAUSER, 1999). Em outros casos as alterações podem estar ligadas a moléculas sinalizadoras que modulam o comportamento, produzidas pelo parasita ou pelo próprio hospedeiro. A infecção com o *Plasmodium sp* causa em fêmeas de *Anopheles stephensi* Liston, 1901 uma reabsorção das células foliculares nos ovariolos e conseqüentemente uma redução do investimento na produção de ovos que, provavelmente, está ligada a alguma molécula sinalizadora moduladora liberada pelo parasita ou hospedeiro, visto que o parasita ainda se encontra no mesêntero no início da reabsorção (HOPWOOD et al., 2001).

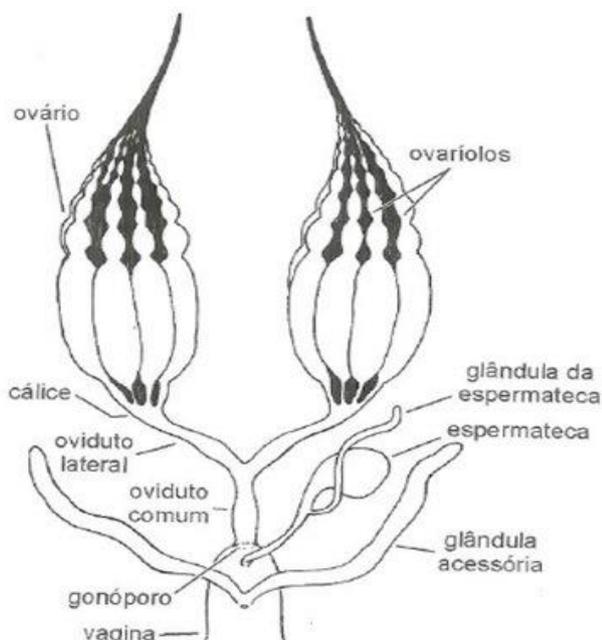
Nos insetos da família Reduviidae, fêmeas de *Meprai spinolai*, quando infectadas com *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, têm gônadas 36.7% mais leves que as não infectadas, apesar do parasita não ter contato direto com as gônadas e outros compartimentos do corpo que não o lúmen do tubo digestivo (BOTTO-MAHAN et al., 2008). Entretanto OLIVEIRA et al., (2010) não encontraram diferenças significativas entre o padrões reprodutivos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, infectados e não infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Embora o comportamento reprodutivo em várias de espécies de Triatominae tenha sido estudado (PIRES et al., 2004; DAFLO-TEIXEIRA et al., 2009; VITTA e LORENZO 2009; PONTES, 2010), em nenhum caso foi avaliado o impacto que a infecção com *T. rangeli* pode causar na biologia reprodutiva nesses insetos.

### **1.1 SISTEMA REPRODUTOR DA FÊMEA DE *Rhodnius prolixus***

O aparelho reprodutor feminino generalizado dos insetos é composto por dois ovários que se conectam a um oviduto lateral cada, que então se fundem formando o

oviduto comum ligado à câmara genital. Lateralmente conectada a esta, encontramos as glândulas acessórias, espermateca (armazena os espermatozoides) e glândula da espermateca (KLOWDEN, 2007) (Figura 2).



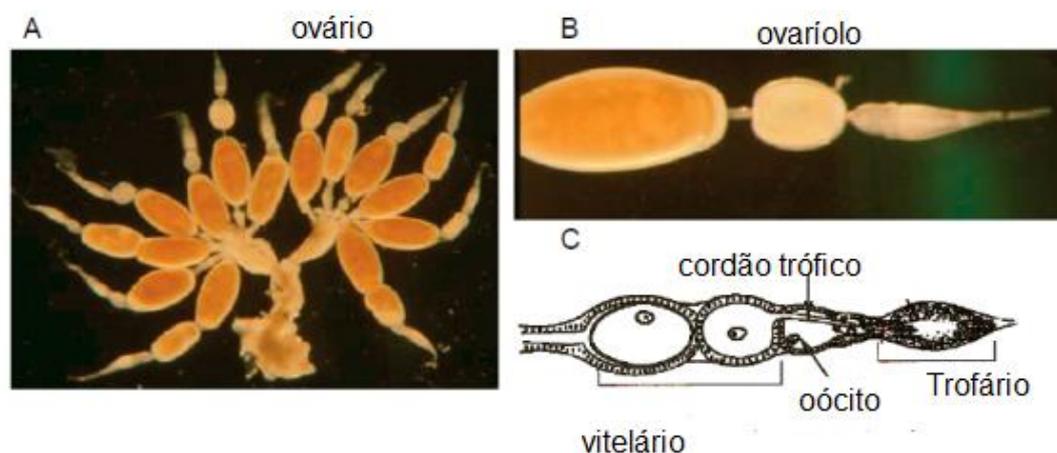
**Figura 1.** Diagrama da estrutura geral do sistema reprodutor feminino de insetos. Fonte: RAFAEL et al (2012).

O ovário é composto unidades semi-cilíndricas denominadas ovariolos que podem ter diferentes formações histológicas em concordância com cada tipo existente. O número de ovariolos que formam um ovário varia normalmente entre 4 e 8 (MARQUES, 2012).

Os ovariolos se unem pelos filamentos terminais na porção superior que se prende à parede corporal e pelo cálice na porção inferior, formando um ovário, que é recoberto por uma túnica própria.

Existem pelo menos três tipos de ovariolos: meroístico telotrófico, meroístico politrófico e panoístico, sendo esses classificados de acordo como os ovócitos são nutridos (BONHAG, 1958). Em *R. prolixus*, assim como nos outros hemípteros, o ovário é do tipo telotrófico (GULLAN & CRANSTON, 2005). Nesse tipo de ovário os trofócitos se mantêm no ápice do ovariolo e um cordão nutridor nutre os ovócitos através de um filamento que descende sozinho. Em *R. prolixus* cada ovário é formado por sete ovariolos meroísticos telotrófico. Nesta espécie o ovário inicia seu

amadurecimento ainda no 5º estágio, onde ocorre um aumento de tamanho, sendo dividido em três fases: proliferativa, fase inicial de diferenciação e fase tardia de diferenciação (LUTZ & HUEBNER, 1980) (Figura 4).



**Figura 2. Ovário de *Rhodnius prolixus*.** Ovário 5 dias após alimentação sanguínea. O ovário é composto por dois hemi-ovários que são conectados por um oviduto comum. Cada hemi-ovário é composto por 7 ovários, na figura A um dos ovários do ovário direito foi retirado e mostrado em detalhe na figura B. Abaixo, na figura C- desenho esquemático das estruturas internas do ovário (ATELLA et al., 2005).

O processo pelo qual os ovos recebem os nutrientes que farão parte do vitelo, reserva de nutrientes utilizada no desenvolvimento e manutenção do embrião durante a embriogênese, é a vitelogênese. Neste processo, o armazenamento de vitelogenina está sob o controle hormonal do hormônio Juvenil e ecdisona, bem como o aumento de proteínas e aminoácidos na hemolinfa e também pela distensão abdominal gerada pelo repasto sanguíneo. O ato de cópula também parece interferir na vitelogênese, uma vez que fêmeas que copularam produzem um maior número de ovos (DAVEY, 1987).

## 1.2 COMPORTAMENTO DE CORTE EM INSETOS

Embora os insetos possuam diferenças morfológicas e comportamentais, de forma geral, estes devem encontrar um parceiro e reconhecê-lo, expressando o comportamento de corte compatível com a espécie (MATTHEWS e MATTHEWS, 2010).

A busca pelo parceiro pode ser facilitada por certos meios de comunicação que podem ser: troca de sinais visuais, sonoros, vibratórios, táteis e químicos (CHAPMAN, 1998). Alguns casos são mais notáveis como ocorre com as cigarras com seus sinais sonoros e os vaga-lumes com sua sinalização por bioluminescência. Além disso, os

insetos podem se agregar ao buscarem o mesmo recurso que pode ser, por exemplo, uma fonte alimentar (GILLOT, 2005).

Os insetos produzem vibrações, que podem ser sonoras ou não, durante seu comportamento reprodutivo. Essas vibrações podem ser obtidas através da fricção entre partes do corpo (estridulação) ou através de percussão no substrato (VIRANT-DOBERLET e COKL 2004). Sinais sonoros também são obtidos através da vibração das asas como ocorre nos machos de flebotomíneos, podendo ser utilizados para identificação de espécies crípticas (VIGODER et al., 2010). Temos como outras formas de reprodução sonora, o zumbido, quando o inseto vibra o corpo sem voar, com ruídos rítmicos através da expulsão do ar pelo órgão *tymbal* ou expulsão do ar através de membrana especializada (SPHINGIDAE) (FRINGS e FRINGS, 1958). Essas vibrações podem ser utilizadas por fêmeas de espécies crípticas para identificar machos da mesma espécie durante o comportamento de corte, evitando assim, formação de híbridos (MAYR, 1977).

Em *Triatoma infestans* Klug, 1834 e *R. prolixus* a estridulação é produzida quando a ponta da proboscide é friccionada contra fenda proesternal, sendo este comportamento expresso quando a fêmea é importunada, como comportamento de rejeição à tentativa de cópula ou à importunação de outro tipo (SCHILMAN e LAZZARI, 2001).

### 1.3 COMPORTAMENTO SEXUAL

O comportamento sexual dos animais sempre foi de interesse dos seres humanos. Como os insetos são seres vivos de grande relevância por seu papel ecológico, como pragas agrícolas ou vetores de patógenos, o seu comportamento vem sendo amplamente estudado ao longo dos anos (KLOWDEN, 2007).

Cimecomorpha é o *taxa* onde estão inclusos vários heteropteras dentre eles, os Reduvidos e os Cimicídeos, ambos com espécies que apresentam hábitos hematofágicos. Na família Cimicídae, os machos iniciam abordagem subindo no dorso da parceira, podendo abordar ambos os sexos: machos e fêmeas (RIVNAY, 1933). Uma vez no dorso, o inseto utiliza seu órgão copulador, chamado de intromitente, para “sondar” a parceira na região próxima a ectoespermalege, local de penetração ou região de entrada do pênis. Os insetos deste grupo são capazes de reconhecer se uma fêmea foi copulada anteriormente, podendo reduzir a quantidade de esperma ejaculado

(REINHARDT et al., 2007). STUTT e SIVA-JOTHY (2001) estudando *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 não observou nenhum caso de rejeição à penetração “traumática” (onde ocorre a perfuração do tegumento da fêmea), na ectoespermalege, situada no abdômen da fêmea e assim ocorre a ejaculação na mesospermalege.

Nos Reduvidos a cópula é muito menos traumática, no entanto, uma quantidade maior de sinalizações e comportamentos estão presentes. Dados da literatura mostram que a cópula nos Triatominae se inicia com o contato físico entre os indivíduos por iniciativa do macho, que sobe na fêmea e a agarra com as suas pernas posteriores. Depois, segurando-a com as pernas, o macho inclina-se lateralmente para permitir a aproximação da sua genitália à da fêmea. Com o auxílio de seus parâmeros, o macho garante o encaixe das genitálias, permitindo a introdução de seu órgão copulador (PIRES et al., 2004).

#### **1.4 COMPORTAMENTO DE GUARDA**

No comportamento de guarda, o macho guarda a parceira por um período de tempo que pode variar de alguns segundos a vários minutos, sendo o tempo necessário para o esperma migrar do espermatóforo para a espermateca ou até a postura dos ovos, sendo este comportamento presente em espécies pertencentes a várias ordens. (SIMMONS, 2001).

Em triatomíneos o comportamento de guarda já foi visto por VITTA e LORENZO (2009), sendo caracterizado pela permanência do macho sobre a superfície dorsal da fêmea após o término da cópula. Este comportamento faz parte das estratégias utilizadas por insetos do sexo masculino na competição do esperma que irá fecundar a fêmea. Outras formas estratégias são a produção de espermatozóides não nucleados e mais de uma forma de espermatozóides (SIMMONS, 2001).

#### **1.5 FECUNDAÇÃO**

Nos insetos a forma de transferência de espermatozóides é através de espermatóforos ou pela da liberação da massa de espermatozóides livres na bursa copulatória da fêmea, como ocorre em muitos endopterigotas (CHAPMAN, 2013). Também podem ocorrer casos como em *Cimex sp.* onde o macho injeta o espermatozoide na fêmea perfurando o tegumento da mesma (CARAYON, 1966).

A espécie *R. prolixus*, assim como a maioria das espécies de insetos, utiliza métodos menos “traumáticos” que é a transferência de espermatóforo. Dessa forma, o espermatóforo é transferido para a bursa copulatória durante a cópula e os espermatozoides então, migram para espermateca, onde são armazenados, sendo a secreção da quarta glândula seminal o principal responsável por esta migração (DAVEY, 1958).

A ovulação pode ocorrer momentos antes da oviposição nas fêmeas que colocam ovos individualmente, como ocorre em *Rhodnius* ou vários dias depois nas fêmeas que fazem postura de massa de ovos (GILLOT, 2005).

A entrada do espermatozoide ocorre quando a ranhura da micrópila do ovo que se move pelo oviduto se posiciona opostamente as aberturas das espermatecas, sendo então provável que o espermatozoide receba sinais químicos do ovócito que o fazem penetrar pela micrópila e dessa forma ocorra a fecundação (DAVEY *apud* GILLOT, 2005).

### 1.6 *Trypanosoma rangeli*

O parasita heteróxico *Trypanosoma rangeli* foi descrito pela primeira vez por Tejera em 1920, sendo posteriormente descrito por diversos autores em inquéritos epidemiológicos (ZELEDÓN, 1955). Este protozoário pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanomastidae que tem como característica, um único flagelo e um kinetoplasto curto (MASLOV *et al*, 2001; OPPERDOES, 1994). Em sua taxonomia à partir de dados morfológicos e ciclo de vida *T. rangeli* é classificado como pertencendo ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Herpetosoma*, secção Stercoraria. Entretanto, possui características de ciclo de vida mais compatíveis com a secção Salivaria, sendo então proposta a criação do novo subgênero *Tejeraia* e transferência da espécie para esta secção (AÑEZ, 1982). Assim, com o intuito de definir mais precisamente a posição taxonômica de *T. rangeli* foram realizadas análises de filogenética molecular de DNA e ssrRNA demonstrando que esta pertencente ao subgênero *Hepertosoma* e está distante filogeneticamente de Salivaria e se agrupa em Estercoraria junto de *T. cruzi* (STEVENS *et al.*, 1999).

*Trypanosoma rangeli* é um parasita heteróxico que possui a capacidade de infectar naturalmente e experimentalmente diversos hospedeiros vertebrados que estão contidos nas ordens Xenartra, Marsupialias, Carnivora, Rodentia e Primates, Chiroptera

infectando inclusive o ser humano (CUBA CUBA, 1998; GUHL & VALLEJO, 2003; GURGEL-GONÇALVES, 2004). Os hospedeiros invertebrados são insetos hematófagos da subfamília Triatomine e pertencem principalmente ao gênero *Rhodnius*, ocorrendo também a transmissão por espécies do gênero *Triatoma* (MONROY et al, 2003; GUHL e VALLEJO, 2003). É considerado patogênico para seu hospedeiro invertebrado e não patogênico para hospedeiros vertebrados (WATKINS, 1971, DE DIEGO, 2006).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo de vida do *T. rangeli* se inicia quando o triatomíneo realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado que possui tripomastigotas sanguíneas circulantes. No intestino do vetor predominam formas tripomastigotas e epimastigotas. Estas últimas atravessam o epitélio intestinal do vetor atingindo a hemocele e se multiplicando no interior de hemócitos ou livres na hemolinfa. As formas epimastigotas migram então para glândula salivar onde sofrem metaciclogênese transformando-se em tripomastigota metacíclicos que são inoculados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (D' ALESSANDRO e SARAIVA, 1998).

A infecção com *T. rangeli* pode ser extremamente patogênica para o seu hospedeiro invertebrado levando-o à morte, em contraste com o que ocorre com o hospedeiro vertebrado. O parasita pode alterar a fisiologia dos triatomíneos alterando equilíbrio hídrico, tempo de muda, sobrevivência, concentração de aminoácidos e microbiota intestinal (GREWAL, 1957; TOBIE 1965; AÑEZ,1984; EICHLER e. SCHAUB, 2002; DE MATTOS, 2014).

### **1.7 PATOLOGIA DA INFECÇÃO POR *T. rangeli* NO INSETO VETOR**

Os estudos sobre a ação patogênica de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado foram iniciados por GREWAL em 1957 ao observar as alterações causadas em *Rhodnius prolixus* como lentidão e aumento do volume hemolinfático. Outros estudos também relataram aumento na mortalidade em quase todos os períodos ninfais de *R. prolixus* infectados, sendo a ninfa de 5º estágio o estágio mais susceptível (GREWAL, 1957; TOBIE, 1956; GOMEZ, 1967). Outro efeito patogênico é o atraso no desenvolvimento do inseto vetor, com um aumento no intervalo entre os períodos de muda (GREWAL 1957; TOBIE 1965 e AÑEZ,1984). Existem ainda, evidencias de que ninfas destinadas a se tornarem fêmeas podem ser mais susceptíveis aos efeitos letais da infecção por *T. rangeli* (TOBIE, 1965). Além disso, podem ocorrer deformidades nos

insetos adultos emergidos como asas com aparência amassada e curtas pela não expansão completa, adultóides, cabeça e protorác dobrados ventralmente e alterações na extensão e espessura da tíbia (WATINKS, 1971).

Segundo GÓMEZ (1967), a mortalidade *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* pode não ser necessariamente devido a` infecção hemolinfática, mas pela própria infecção intestinal. Por outro lado, WATIKINS (1971) descreve diversas alterações teciduais em vários órgãos e sistemas dos insetos infectados, como destruição dos plasmatócitos fagocíticos e destruição das traqueias, estando essas alterações envolvidas na mortalidade dos insetos durante a infecção.

Na luz intestino do inseto *T. rangeli* ocorre principalmente sob a forma epimastigota, interagindo com a dieta, resposta humoral e com a microbiota do inseto presente no intestino. Segundo EICHLER & SCHAUB (2002) ninfas de 5º instar de *R. prolixus* axênicos colonizadas com *Rhodococcus rhodnini* Goodfellow & Alderson, 1979 e infectdas com *T. rangeli* tiveram uma redução de 50% na população desta bactéria na região estomago. De forma semelhante, ninfas de 4º instar de *R. prolixus* infectadas por via oral com epimastigotas de *T. rangeli* apresentaram uma diminuição de unidades formadoras de colônias no conteúdo intestinal, além de uma alteração na expressão de mRNA dos peptídeos antimicrobianos (DE MATTOS, 2014). O parasita ainda reprimiu a expressão gênica de genes relacionados à expressão de óxido nítrico (NO), evitando assim ser danificado por estas moléculas que fazem parte da resposta humoral do inseto (WHITTEN et al, 2007).

A fisiologia do tubo digestório pode ser alterada de diversas formas pela infecção. fFêmeas de *R. prolixus* infectadas podem ter a motilidade do intestino posterior diminuída, ocorrendo também diminuição da excreção, com acúmulo de uratos, aumento da hemolinfa e concomitante diminuição de material fecal, sendo em alguns casos o inseto incapaz de realizar excreção (WATKINS, 1971).

*T. rangeli* interage com a parede intestinal dos insetos a fim de atingir a cavidade celomática do inseto. A membrana perimicrovilar dos insetos hospedeiros representa uma barreira física para o parasita, visto que nos insetos expostos à radiação gama, ocorre a inibição da formação dessa membrana e desorganização das microvilosidades. Dessa forma, o parasita atravessa mais facilmente para cavidade celomática do inseto (GOMES et al, 2002). *T. rangeli* interage intimamente com a

membrana perimicrovilar e prefere as células epiteliais menos densas com muitas mitocôndrias, sendo possível observar vários epimastigotas interagindo com uma mesma célula. A interação ocorre pelo flagelo em áreas de contato entre duas células epiteliais ou entre extremidade posterior do parasita e a região central da célula epitelial (HECKER e RUDIN, 1990; OLIVEIRA e SOUZA, 2001).

Na passagem do tubo digestivo para hemolinfa *T. rangeli* interage com a musculatura associada ao epitélio do intestino em infecções leves degenerando a região invadida, enquanto que em infecções pesadas ocorre vacuolização do epitélio intestinal com vários parasitas nos vacúolos e diversos núcleos picnóticos, além de extensas áreas intestinais substituídas por parasitas em divisão (WATINKS, 1971).

Ao atingir a cavidade celomática e hemolinfa, o parasita se depara com o sistema imune do inseto que tenta debelar a infecção. Os insetos não possuem resposta imune adaptativa como os mamíferos, embora possuam um sistema imune com a capacidade de responder a vários tipos de patógenos. As respostas imunes em insetos podem ser divididas em dois tipos: resposta imune celular que é responsável por encapsulamento de patógenos (envolto por células como granulócitos e plasmatócitos) e formação de nódulos (melanização de corpos estranhos por ativação da enzima profenoloxidase) e a resposta imune humoral que envolve a liberação de microbicidas e melanização de corpos estranhos (KLOWDEN, 2007, GOMES, 2003).

Neste contexto, embora exista uma grande quantidade de artigos na literatura que tratem da interação parasita vetor entre *T. rangeli* e *R. prolixus*, estes estudos se concentram na interação do parasita com o tubo digestório do inseto e com o sistema imunitário. Diante do conhecimento deste modelo de infecção, onde o parasita atravessa o epitélio intestinal, invade a cavidade celomática, cai na hemolinfa, dispara respostas celulares e humorais do sistema imune, se dispersa e pode se instalar em vários órgãos do inseto, busca-se entender como este processo pode influenciar e interferir na reprodução desses triatomíneos. Sendo assim, neste trabalho, investigamos as alterações no comportamento reprodutivo e na reprodução de fêmeas de *R. prolixus* que receberam alimentação infectante com *T. rangeli*, com o intuito de entender o impacto da infecção na fisiologia reprodutiva destes inseto.

## **2.OBJETIVO GERAL**

Identificar possíveis alterações no comportamento sexual e reprodutivo de fêmeas *Rhodnius prolixus* infectadas por *Trypanosoma rangeli*.

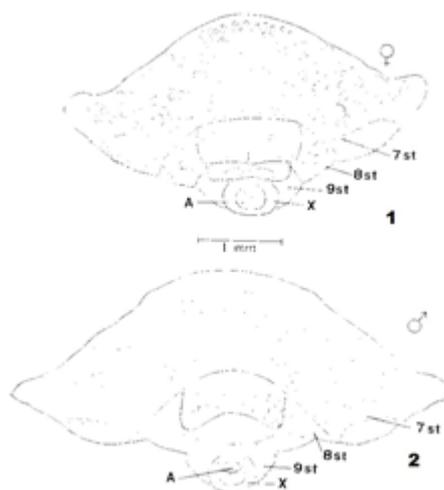
### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o comportamento de cópula em insetos infectados e não infectados;
- Avaliar a fecundidade das fêmeas infectadas e não infectadas;
- Avaliar a fertilidade dos ovos das fêmeas infectadas e não infectadas;
- Analisar os tecidos ovarianos das fêmeas infectadas e não infectadas por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

### 3.METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS:

Os insetos utilizados foram obtidos de colônias mantidas em insetário do Setor de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ. Destas colônias, foram separadas ninfas de 5º estágio, que foram sexadas, através diferenciação das estruturas das placas genitais, em lupa estereoscópica, utilizando como referência a figura 3, trabalhando assim com machos e fêmeas virgens, que foram mantidos separados por sexo em um cristalizador de vidro (15 cm de diâmetro x 30 cm de altura), fechado com tela de náilon, envolto por cartolina preta. No interior, colocou-se papel de filtro sanfonado, com o objetivo de aumentar a superfície de contato e a possibilidade de refúgio, bem como retirar o excesso de umidade. A colônia foi alimentada semanalmente com sangue de camundongo suíço (Protocolo CEUA - FIOCRUZ LW-14/10), e mantida em estufa BOD a 29°C e 80% UR, com fotoperíodo de 12 horas.



**Figure 3.** Desenho das placas genitais da ninfa de 5º estágio de *T. brasiliensis* Neiva, 1911. Placa genital da fêmea (1), placa genital do macho (2) (JURBEG *et al*, 1986).

#### 3.2 MANUTENÇÃO DE *Trypanossoma rangeli*:

Os parasitas, cepa Macias foram mantidos a 28°C em meio LIT + NNN (JAFÉ *et al.*, 1984; CHIARI & CAMARGO, 1984) suplementados com 20% de soro fetal

bovino inativado. Os epimastigotas (99-100%) foram obtidos na fase de crescimento exponencial (5-7 dias de cultura).

### 3.3 INFECCÃO ORAL:

A dieta sanguínea foi inicialmente preparada por centrifugação (300g/10min) de sangue de carneiro citrado. Após esta etapa o plasma foi separado e inativado por aquecimento a 57°C durante 40 minutos. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina tamponada (0,01M tampão fosfato, 0,15M NaCl, Ph 7,2) em repetidas centrifugações. A contagem dos parasitas foi realizada utilizando câmara de Neubauer e 10µL de meio cultura e contador manual de quatro dígitos e microscópio óptico Nikon modelo Eclipse E-2000 com aumento de 400 vezes. O preparo da dieta foi concluído adicionando-se aos eritrócitos lavados plasma e meio de cultura contendo epimastigotas numa concentração final de  $1 \times 10^6$  parasitas/ml. Os insetos controle foram alimentados com sangue seguindo a mesma metodologia, porém, com meio de cultura estéril. O sistema de alimentação era formado por:

- Aparelho de banho-Maria
- Bomba de aquário modelo T-250 Turbo flex
- Tubos flexíveis de silicone
- Alimentador de vidro (mamadeira)
- Termômetro
- Água.
- Pedaco de luva de látex
- Haste de metal universal
- Pinça de metal para condensador

Para a montagem do sistema de alimentação, o alimentador de vidro (mamadeira) teve a extremidade inferior fechada com pedaco de luva de látex, previamente lavado exaustivamente com salina, que serviu como sistema de alimentação. O alimentador de vidro (mamadeira) foi conectado por seus tubos laterais de vidro aos tubos de silicone, sendo o tubo de silicone ligado ao tubo inferior do alimentador conectado também à bomba, enquanto que o tubo de silicone conectado ao tubo lateral superior teve a outra extremidade posicionada livre no recipiente do aparelho de banho-maria. A água que circulava dentro desse sistema aquecia o sangue a 37°C, sem ter contato direto com sangue. Apesar de o

banho-maria contar com um termostato, a temperatura da água foi monitorada com auxílio de um termômetro, continuamente, durante o experimento. A mamadeira foi presa a uma haste universal de metal com o auxílio de uma pinça de metal para condensador, para que fosse possível acoplar o recipiente cilíndrico (copo) com os triatomíneos, fechado com tecido de náilon, permitindo o acesso do inseto ao alimento quando o recipiente foi justaposto á membrana de látex. Todo o sistema de alimentação montado pode ser visto na figura abaixo (figura 4).

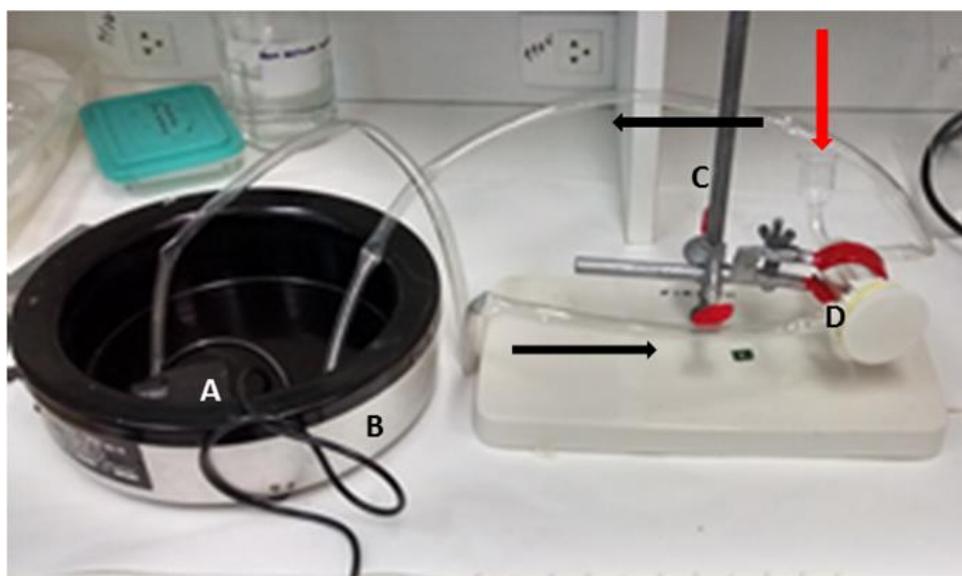


Figura 4. **A-** bomba de aquário, **B-** Banho-maria, **C-** pinça presa à haste de metal, **D-** alimentador de vidro (mamadeira) com membrana de látex. As setas de cor negra indicam a direção do fluxo da água, enquanto a seta vermelha o local onde o sangue é colocado.

Os experimentos foram realizados com grupos de casais assim determinados: 1. controle (♀ não infectadas + ♂ não infectados); 2. infectado ♀ infectadas + ♂ não infectados.

### 3.4 COMPORTAMENTO DE CÓPULA:

Para monitorar a cópula, foram selecionados aleatoriamente, um macho e uma fêmea, sendo colocados aos pares em placas de Petri com 15 cm de diâmetro e forradas com papel filtro. A observação do comportamento de cópula foi realizada em dois casais ou quatro casais por vez. Cada casal teve 25 minutos para iniciar a cópula, caso contrário, eram substituídos. Foram utilizados 17 casais no grupo controle e 20 casais

no grupo infectados. Quando os insetos falharam em realizar a cópula estes foram excluídos das análises dos outros tipos de comportamento e da contagem de número de ovos e ninfas. Dessa forma o número de insetos é reduzido depois do comportamento pré-cópula, sendo novamente reduzido na análise do comportamento de guarda uma vez que nem todos os insetos realizaram este comportamento.

Para análise temporal o comportamento foi dividido em três intervalos de tempo:

- **pré-cópula**- Intervalo desde o primeiro segundo que macho e fêmea estão presentes até o encaixe das genitálias, incluindo portanto a corte.
- **cópula**- Intervalo entre o encaixe e a separação das genitálias
- **comportamento de guarda** - Intervalo de tempo em que o macho se posicionou sobre a fêmea após a cópula.

Estes intervalos temporais foram medidos com auxílio de cronômetro digital. Em um grupo de sete casais foi realizada a filmagem completa da cópula utilizando filmadora DCR- PJ5 Handycam Sony associada a um tripé para filmagem. Durante acompanhamento da expressão do comportamento reprodutivo de três casais foram realizados apenas registros fotográficos, utilizando-se câmera fotográfica digital, modelo DSC-H50 9.0 megapixels.

### 3.5 DISSECÇÃO

Aos 90 dias após a cópula os espécimes foram dissecados. Para isto, os espécimes foram alfinetados no pronoto e fixados a uma placa de Petri com parafina. Após a retirada das asas, foi feito um corte longitudinal no conxivo, de ambos os lados, para remoção dos tergitos abdominais, sendo utilizada solução fisiológica (0,7% NaCl + 0,3% KCl) a fim de evitar o ressecamento do ovário. O procedimento de retirada dos órgãos foi realizado utilizando lupa estereoscópica.

### 3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

Para analisar alterações morfológicas causados pela parasitemia os ovários de fêmeas infectadas (n=2) e não-infectadas (n=2) por 90 foram removidos e transferidos para o glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de sódio (Caco) 0,1M, pH 7.2 por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas em Caco e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em Caco, pH 7.2, por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Logo após, foram desidratados em gradientes crescentes de álcool (50%, 70%, 90% e

100%), e incluídos em resina epoxi Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo 1%, seguindo-se observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL modelo JEM 1011 na Plataforma de Microscopia Eletronica Rudolph Barth do Instituto Oswaldo Cruz.

### **3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS:**

Para realizar as análises estatísticas foram utilizado o programa Microsoft Excel versão 2010 e GraphPad Prism. versão 6.1. Foram utilizados o teste D'Agostino-Pearson omnibus test para atestar normalidade das amostras e o teste não pareado Mann Whitney test. Os resultados foram considerados significativos quando  $P > 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL E REPRODUTIVO DE *Rhodnius prolixus*

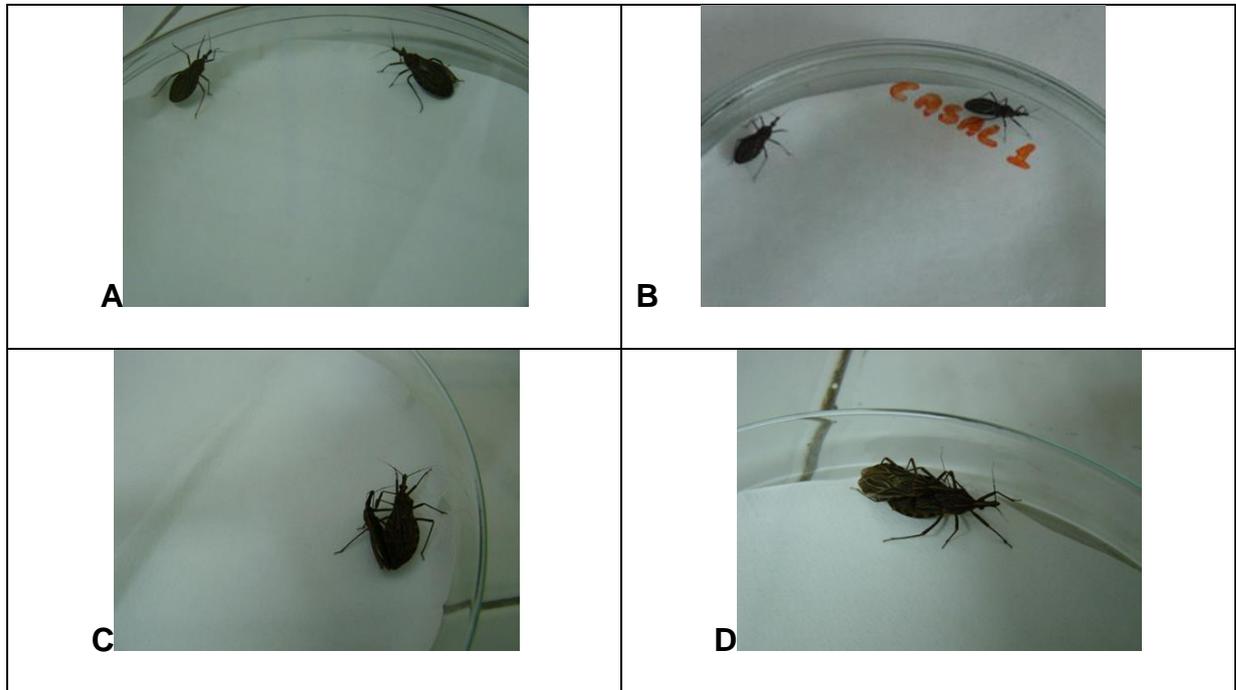
#### PERÍODO DE PRÉ-CÓPULA (CORTE):

No piloto para o comportamento de cópula, onde os insetos não foram alimentados depois da muda, ocorreu 100% de rejeição dos casais. Entretanto, os insetos machos realizaram comportamento de corte e tentativas de encaixe das genitálias. As fêmeas demonstraram comportamento de rejeição ao macho, se deslocando rapidamente para outro ponto da placa, sempre que ocorria aproximação do macho ou nivelando o corpo ao substrato a cada tentativa de encaixe das genitálias.

No segundo grupo formado por 17 insetos controle e 20 insetos infectados que receberam alimentação antes do experimento de cópula foi observado que ao colocar macho e fêmea na arena de vidro, os insetos realizaram uma volta completa fazendo o reconhecimento do local (Figura 5A) ou tentando fugir do recipiente. Quando o macho percebeu a fêmea, estes começaram a interagir. Dessa forma, foi observado a passagem do macho em cima da fêmea e alguns casos a fêmea também realizou esse mesmo comportamento. O macho, apresentando as antenas eretas, se deslocou em direção à fêmea. Logo depois, com a cabeça levemente erguida, o macho parou bruscamente a poucos milímetros da fêmea (Figura 5B) e então subiu em seu dorso, com as patas flexionadas de forma a segurá-la utilizando os dois primeiros pares de patas que se apoiaram na face ventral do conexivo da fêmea. Foi também observado que em alguns casais, o macho apoiou o primeiro par de patas no tórax da fêmea, sendo este comportamento observado apenas com fêmeas pequenas. Nos casos em que o macho se aproximou frontalmente ou lateralmente da fêmea, este girou o próprio corpo até que as genitálias se posicionassem no mesmo sentido e direção, e dessa forma o macho se manteve sobre a fêmea.

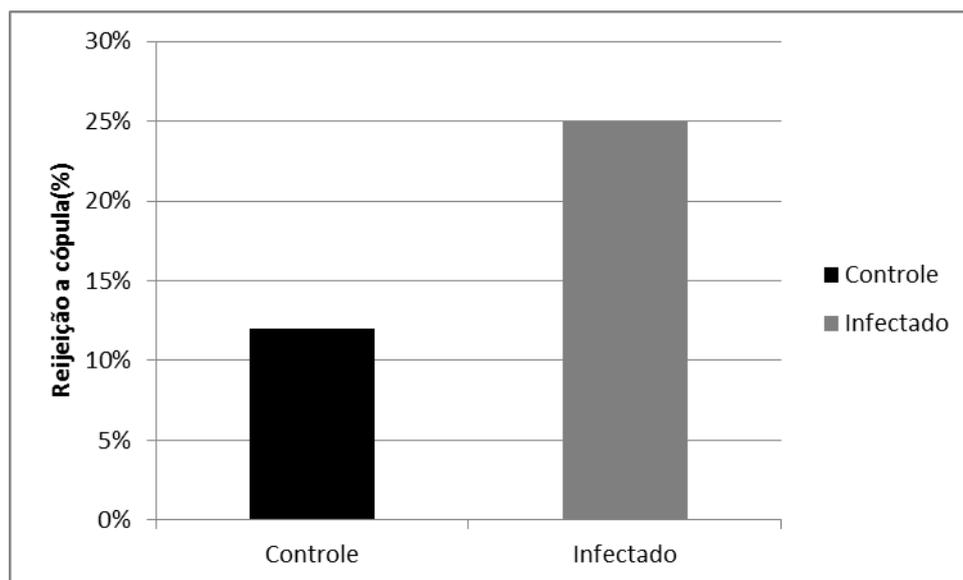
Uma vez que o macho conseguiu se estabelecer no dorso da fêmea, deslocou-se para lateral do corpo da mesma de forma que a face ventral deste tocou o conexivo da fêmea. Ocorreu também deslocamento corporal em direção ao extremo posterior, local onde está a abertura genital da fêmea. A partir deste ponto, foi observado dois tipos de comportamentos nas fêmeas: no primeiro ela permitiu que o macho promovesse o encaixe das genitálias e no segundo rejeitou o macho dificultando o encaixe das

genitálias levantando assim a parte posterior do corpo e movimentando esta toda vez que o macho tentava promover o encaixe das genitálias ou então nivelando o corpo ao substrato. Nos casos onde ocorreu a rejeição, o macho reiniciou o comportamento de corte até conseguir promover o encaixe (Figura 5C).



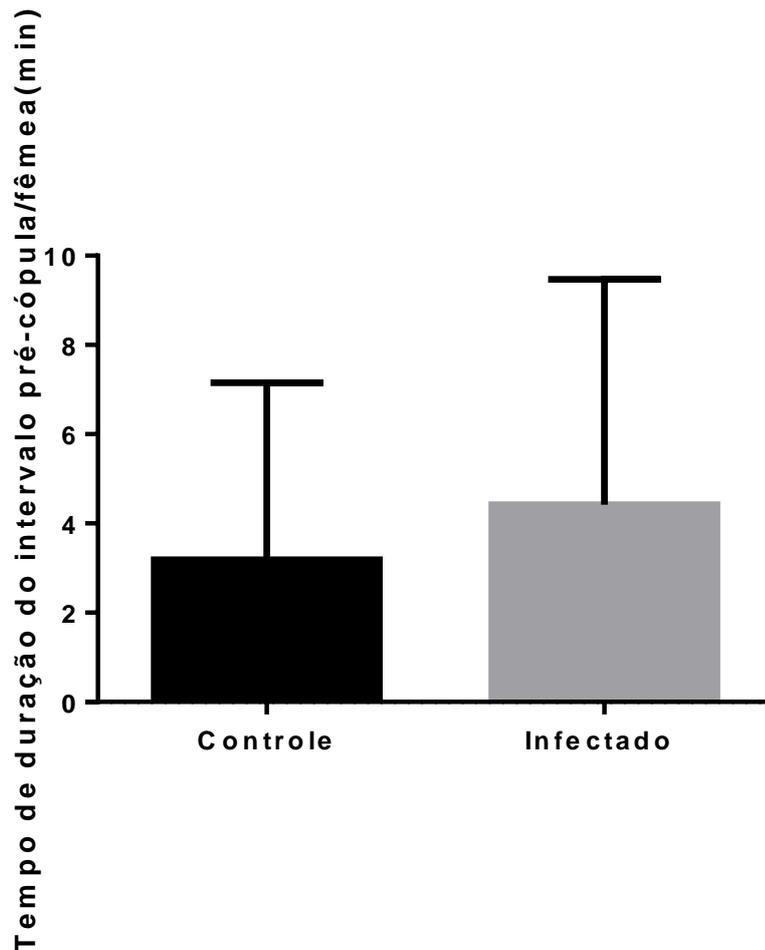
**Figura 5.** Momentos da cópula de *Rhodnius prolixus*. A- Macho e fêmea testando a arena; B- Macho se aproximando da fêmea; C- Macho e fêmea em posição de cópula; D- Macho em posição de guarda.

Neste período do comportamento sexual ocorre o reconhecimento entre machos e fêmeas, sendo analisados 17 casais no grupo controle e 20 casais no grupo infectado. Neste período do comportamento reprodutivo, a fêmea pode rejeitar ou aceitar o macho. Os *displays* de rejeição foram iguais nos grupos: controle e infectado. As rejeições ocorreram principalmente por parte das fêmeas. Nos casais cuja fêmea estava infectada ocorreu rejeição ao ato de cópula em 25% dos casos (n= 5). E nos casais em que a fêmea não estava infectada ocorreram apenas 12 % (n=2) de rejeições (gráfico 1).



**Gráfico 1:** Porcentagem de rejeição ao ato de cópula após o alojamento dentro da arena. O grupo infectado (n= 20) representa casais cujo macho receberam alimentação livre de parasitas e as fêmeas que receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue.

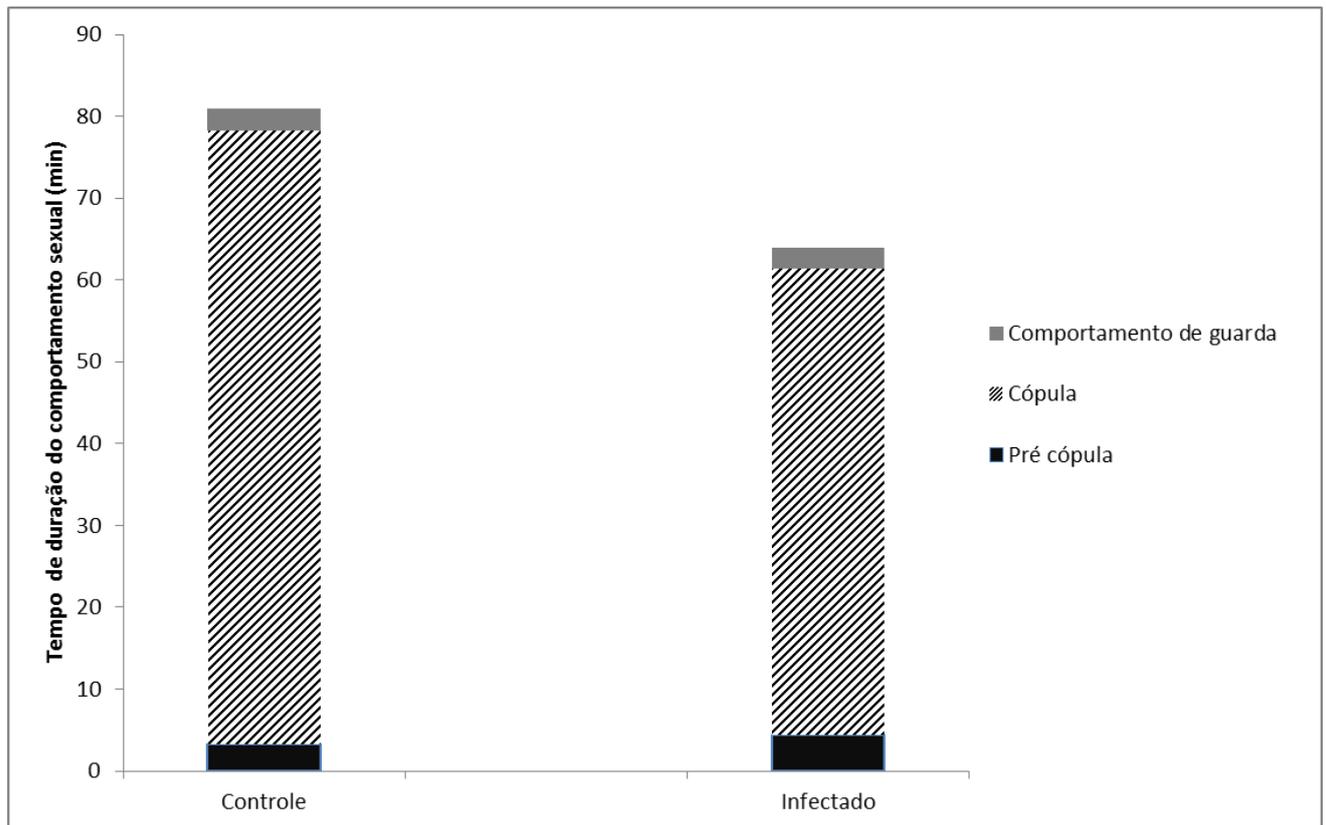
A média de tempo de duração do intervalo pré-cópula em casais cuja fêmea não estava infectada foi de  $3,2 \pm 0,96$  (desvio padrão) (n=17), enquanto que no grupo com fêmeas infectadas foi de  $4,4 \pm 1,1$  (desvio padrão) (n=20) (Gráfico 2). A diferença foi considerada não significativa (p= 0.4192).



**Gráfico 2:** Tempo de duração do intervalo pré-cópula de casais formados por um macho e uma fêmeas de *R. prolixus*. O grupo controle (n= 15) representa casais com machos e fêmeas que receberam alimentação livre de parasitas (*T. rangeli*). O grupo infectado (n=15) representa casais cujo macho recebeu alimentação livre de parasitas e as fêmeas que receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue. O teste utilizado foi teste t não pareado com Mann Whitney test com intervalo de confiança de 0.05.

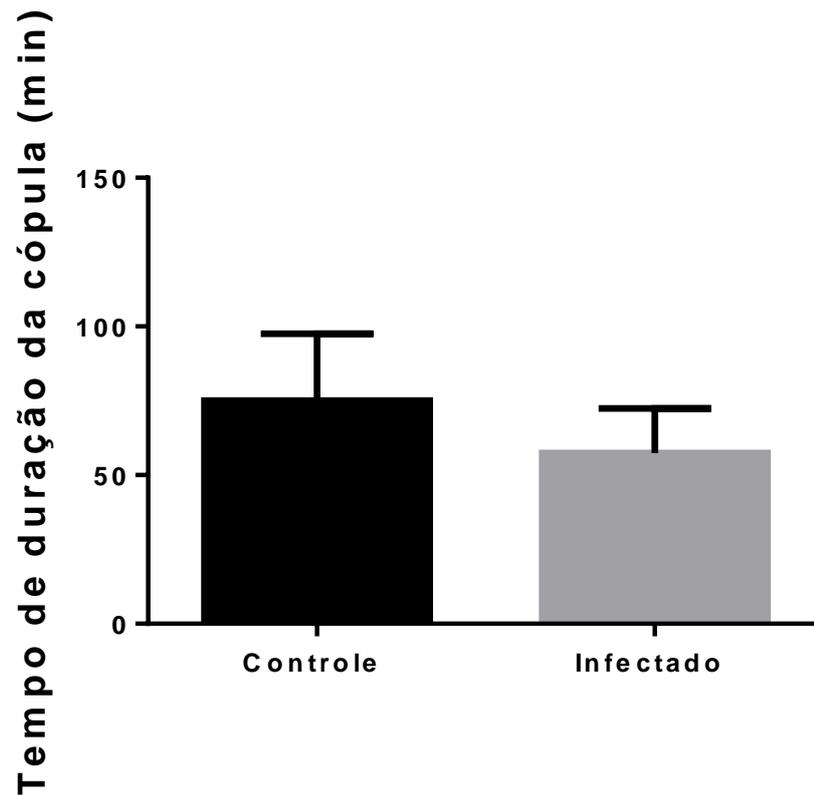
### PERÍODO DE CÓPULA:

Durante a cópula, macho e fêmea permaneceram estáticos a maior parte do tempo raramente se movimentando, embora em alguns casos a fêmea tenha se locomovido carregando o macho conectado a sua genitália, e este permaneceu estático durante todo período de cópula. A cópula foi o comportamento que predominou, durante o total do comportamento sexual (Gráfico3).



**Gráfico 3.** Tempo de duração de cada comportamento sexual de *Rhodnius prolixus*. No grupo dos casais controle o comportamento pré-cópula durou 3,2 minutos, cópula 75 minutos e C. guarda 2,7 minutos. No grupo infectado os comportamentos pré-cópula 4,4, cópula 57 minutos e C. guarda 2,5 minutos. O grupo controle (n= 17) representam casais com machos e fêmeas que receberam alimentação livre de parasitas (*T.rangeli*). O grupo infectado (n=20) representa casais cujo macho recebeu alimentação livre de parasitas e as fêmeas que receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue.

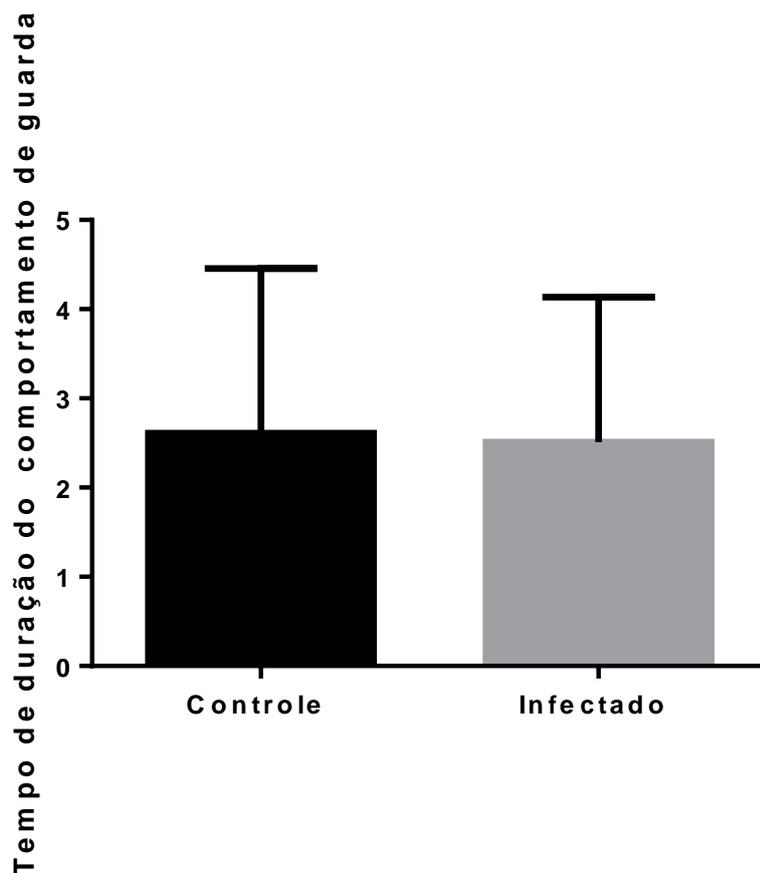
No grupo controle, onde tanto o macho quanto a fêmea receberam alimentação livre de parasitas, a cópula teve duração média de 70 minutos e no grupo dos infectados, onde somente a fêmea recebeu alimentação infectante e o macho alimentação livre de parasitas, o comportamento de cópula teve duração média de 52,0 minutos ( gráfico 4). Ocorrendo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo médio de duração da cópula no grupo controle e no grupo infectado.



**Gráfico 4:** Tempo de duração da cópula de casais formados por um macho e uma fêmea de *R. prolixus*. O grupo controle (n= 15) representa casais com machos e fêmeas que receberam alimentação livre de parasitas (*T.rangeli*). O grupo infectado n=15) representa casais cujo macho receberam alimentação livre de parasitas e as fêmeas que receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue. O teste utilizado foi teste t não-pareado com Mann Whitney test com intervalo de confiança de 0.05. O valor  $p < 0.05$  e a diferença no tempo de cópula foi considerada significativa.

#### **PERÍODO DE GUARDA:**

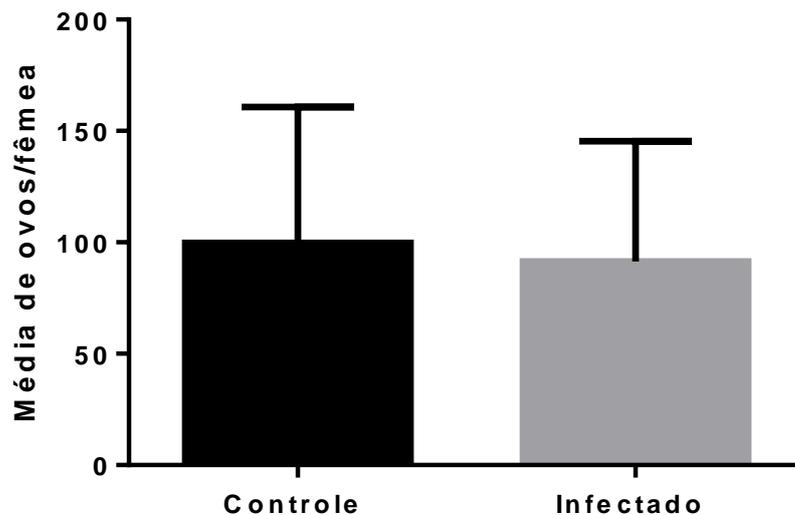
A desunião das genitálias de macho e fêmea marcou o fim da cópula, alguns machos expressaram o comportamento de guarda que consistiu basicamente do inseto macho se deslocar para o dorso da fêmea e se manter com as antenas eretas (Figura 5D). O tempo médio de duração desse comportamento foi de 2,6 minutos no grupo controle e de 2,5 no grupo infectado.



**Gráfico 4:** Tempo de duração do comportamento de guarda após a cópula de casais (machos e fêmeas) de *R. prolixus*. O grupo controle (n= 12) representa casais que receberam alimentação livre de parasitas (*T. rangeli*). O tempo médio de duração desse comportamento foi de 2,6 minutos no grupo controle e de 2,5 no grupo infectado. O grupo infectado (n=12) representa casais cujo macho recebeu alimentação livre de parasitas e as fêmeas receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue. O teste utilizado foi teste t não-pareado com Mann Whitney test com intervalo de confiança de 0.05.

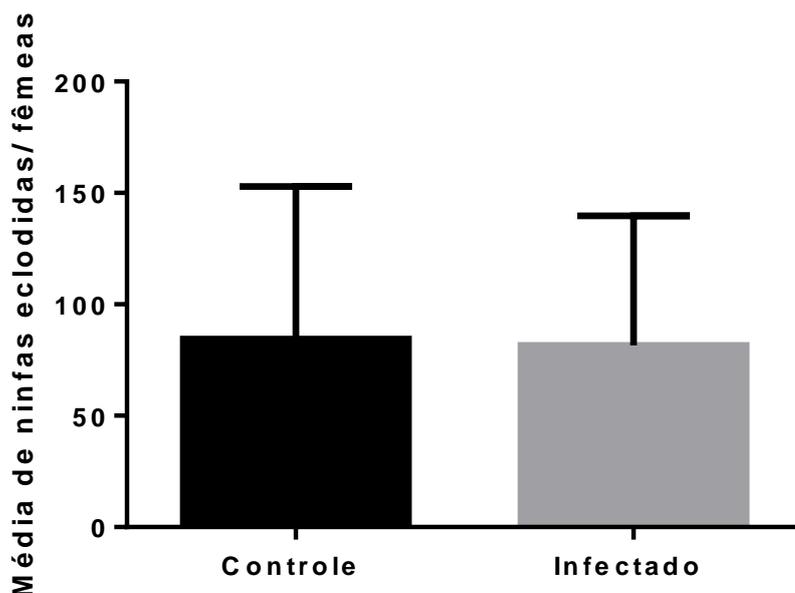
## 4.2 ANÁLISE DO SUCESSO REPRODUTIVO

O número de ovos postos por fêmea foi contabilizado a fim de se comparar o número de ovos postos por fêmeas infectadas e não infectadas. As fêmeas do grupo controle não infectadas realizaram a postura média de 99,8 ovos (n =15) ovos enquanto as fêmeas do grupo infectado realizaram a postura de 91,4 (n=15 ). O resultado não foi estatisticamente significativo (gráfico 5).



**Gráfico 5** Média de ovos por fêmea de *R. prolixus* que realizou cópula. O grupo controle (n= 15) foi formado por fêmeas que receberam alimentação livre de parasitas, sendo a postura de ovos média 99,8 ovos/ fêmea . O grupo infectado (n=15) representa fêmeas que receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue, sendo a média de ovos postos 91,4 ovos /fêmea. O teste utilizado foi teste t não-pareado com Mann Whitney test com intervalo de confiança de 0.05.

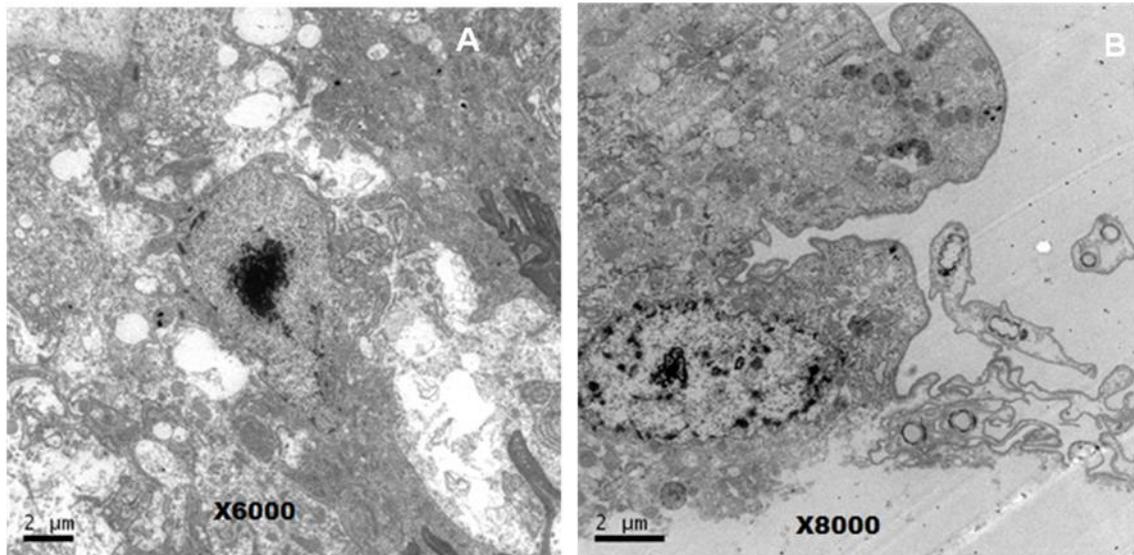
A fecundidade das fêmeas foi analisada ao estudarmos o número de ninfas eclodidas para cada uma. As fêmeas controle tiveram uma média de 84,5 ninfas enquanto as infectadas apresentaram uma média de 81,6. As médias não foram significativamente diferentes (gráfico 6).



**Gráfico 6** Média de ninfas eclodidas por fêmea de *R. prolixus* que realizou cópula. O grupo controle (n= 15) representa fêmeas que receberam alimentação livre de parasitas (*T.rangeli*). O grupo infectado (n=15) representa fêmeas que receberam alimentação contendo  $1 \times 10^6$  parasitas/mL de sangue. As fêmeas do grupo controle tiveram eclosão média 84,5, ninfas. Enquanto no grupo infectado eclodiu uma média 81,6 ninfas (n=15) por fêmea. O teste estatístico realizado foi Teste t não pareado com teste Mann-Whitney test data e obteve-se  $p= 0,99$ .

#### 4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO OVÁRIO DE FÊMEAS DE *R. prolixus*.

As células ovarianas das fêmeas de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* apresentaram núcleo com cromatina dispersa e desorganizada (kariorrexis) sugerindo fragmentação nuclear (Figura 6B); as células foliculares revelaram a presença de grandes vacúolos contendo restos de organelas e o epitélio folicular mostrou-se com áreas de lise citoplasmática, indicativo de um processo autofágico (Figura 6B). Essas alterações sugerem degeneração dos folículos ovarianos, sugestivo de um processo chamado atresia. Em contraste, o grupo dos insetos controle apresentou núcleo bem organizado, com cromatina condensada (Figuras 6A).



**Figura 6 .** Micrografia eletrônica de transmissão do ovário de fêmeas de *R. prolixus* 90 dias após primeira alimentação: A- Controle (n=2) (6000x); B- Infectado (n=2) com *T. rangeli* (8000x);. Núcleo (n) e traquéolas (t).

## 5. DISCUSSÃO

Apesar de a literatura existente abordar o comportamento sexual de *R. prolixus*, analisar alterações no comportamento de cópula destes triatomíneos infectados por *T. rangeli* é uma tarefa difícil, uma vez que existem poucas referências bibliográficas que abordem o assunto. O cenário em que o comportamento sexual de *R. prolixus* ocorre na natureza provavelmente é poliândrico, onde uma fêmea copula com vários machos (PONTES, 2010). Entretanto, experimentalmente, seria mais difícil avaliar o impacto da infecção com *T. rangeli* neste cenário.

Alguns autores apontam que o comportamento de cópula com sinais físicos visíveis é iniciado pelo macho com a fêmea assumindo um papel mais passivo, onde esta reage aos estímulos dados pelo macho durante o período pré-cópula (corte) (MANRIQUE e LAZZARI, 1999; VITTA e LORENZO, 2009 & PIRES et al., 2004). Registros da literatura relatam que em triatomíneos, o tempo médio de intervalo pré-cópula em *Triatoma brasiliensis* é de 7 minutos (BRASILEIRO, 1984 *apud* VITTA e LORENZO, 2009), enquanto que em *Panstrongylus megistus* esse comportamento dura em média 29,3 minutos (LIMA et al., 1986). Esta observação caracteriza um tempo maior do que o apresentado em nossos resultados para *R. prolixus*, onde os casais do grupo controle tiveram um tempo médio de 3,18 minutos nesta fase do comportamento reprodutivo, em contraste com os insetos infectados que foi de 4,4 minutos. Estes distintos padrões podem estar relacionados a uma série de fatores externos, os quais podem modificar este comportamento, sendo um destes, alterações em glândulas produtoras de feromônios. Neste contexto, PONTES (2010) observou que a fêmea de *R. prolixus*, utiliza feromônios para atrair o macho. Em relação à infecção, HURD e PARRY(1991) observaram a diminuição da produção de feromônios em fêmeas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Hymenolepis diminuta*. Em nosso trabalho, observamos que nos casais cuja fêmea estava infectada, ocorreu rejeição ao ato de cópula. Este comportamento pode estar relacionado a alterações de feromônios sexuais. No entanto, essa observação necessita ser mais aprofundada.

Em *R. prolixus* a média do tempo de cópula observada no grupo controle foi de 75 minutos, sendo a do grupo infectado 57,3 minutos. Nos dois grupos, foi tempo suficiente para que ocorresse a fertilização da fêmea na maior parte dos casos, apesar de ter ocorrido uma diminuição significativa no tempo de cópula nos insetos infectados

( $p < 0.05$ ). Essa diminuição pode estar ligada ao fato do parasita causar danos fisiológicos ao vetor, inclusive à musculatura do inseto (WATINKS, 1971).

Em nossos experimentos, o comportamento de guarda pós-cópula foi analisado em casais solitários. Durante os experimentos foi possível observar que os machos de *R. prolixus* reassumiam o comportamento quando algum objeto se aproximava da fêmea, por exemplo, quando estes iriam ser retirados da placa. Seria ideal avaliar este comportamento em condições onde existisse mais de um macho por fêmea uma vez que VITTA e LORENZO (2009) demonstraram um aumento na frequência deste comportamento, quando existe mais de um macho na arena ao final da cópula. A infecção não demonstrou alteração significativa no tempo em que o macho realiza o comportamento de guarda após cópula, sobre fêmeas infectadas e não infectadas, inclusive apresentaram média de tempo bem semelhantes, onde o grupo controle apresentou média de 2,6 minutos e grupo infectado média de 2,5 minutos.

Quanto aos efeitos do parasita sobre a ovipostura e a geração de descendentes, os experimentos não foram capazes de demonstrar alterações significativas, entre a média de ovos postos por fêmeas controle (99,8 ovos/fêmea) e fêmeas infectadas (91,4 ovos/fêmea). Entretanto, os resultados de FELLETT et al., (2014), demonstraram que ocorreu uma redução no número de ovos postos por fêmeas de *R. prolixus* infectadas por *T. rangeli*, utilizando a cepa CHOACHI. Quanto ao número de ovos que eclodiram liberando ninfas, também não houve alteração significativa entre insetos controle (84,5, ninfas/fêmea) e infectados (81,6 ninfas/fêmea), embora FELLETT et al., (2014) tenha encontrado diferença significativa demonstrando queda no número de ovos eclodidos. As discrepâncias encontradas entre nosso trabalho e o de FELLETT et al., (2014) podem estar relacionadas a alguns fatores, como: a cepa utilizada, uma vez que moléculas de superfície de parasitas de cepas diferentes podem ser distintas de acordo com a origem do isolado primário e das condições de cultivo; e o método utilizado para infecção dos insetos, uma vez que em nossos experimentos, devido ao estudo comportamental, buscamos reduzir os danos ao inseto e dessa forma, a única via utilizada para infecção foi a oral, diferindo do FELLETT et al., (2014) que utilizou além da infecção oral a injeção intracelomática, a qual garante um maior número de parasitas na cavidade celomática e conseqüentemente um maior dano por ação do parasita.

Na infecção oral, ocorre um complexo processo de interação parasita-vetor. Uma vez no trato digestório do inseto, os parasitas interagem com barreiras bioquímicas como proteases digestivas presentes no intestino que podem modular a infecção,

selecionando os parasitas e, portanto favorecendo ou não a infecção. Durante a infecção oral, *T. rangeli* interage com a microbiota intestinal, que é uma importante fonte produtora de vitaminas, provavelmente vitamina B (HARINGTON, 1960). Indivíduos aposimbiontes podem apresentar uma série de distúrbios devido à falta destes nutrientes (EICHLER e SCHAUB, 1998; BEN-YAKIR, 1987). Estas alterações causam mudanças na expressão de lisozimas e defensinas nos diferentes compartimentos do intestino do inseto vetor, além de redução na população de *Serratia marcescens* que possui conhecida ação tripanolítica (De MATTOS, 2014) e desta forma também podem modular o processo infectivo. Apesar da necessidade de driblar a ação protetora da microbiota, *T. rangeli* precisa interagir com a membrana perimicrovilar para aderir e atravessar o epitélio intestinal a fim de invadir a hemocele do inseto. Dados da literatura relatam que a rota de invasão pode ser por entre as células do epitélio intestinal ou por via intracelular causando danos à parede intestinal do inseto vetor (DE OLIVEIRA e SOUZA, 2001; HECKER et al., 1990; GOMES et al., 2002). Uma vez na hemocele, *T. rangeli* necessita vencer as barreiras imunológicas do inseto. Alguns estudos apontam *T. rangeli* como imunossupressor de *R. prolixus* (GARCIA et al., 2004; GOMES et al., 1999). GARCIA et al., (2004) discute que a ação imunossupressora de *T. rangeli* pode estar relacionada à indução da produção de eicosanóides que possuem papel regulador do sistema imune. Quando *T. rangeli* atravessa o epitélio intestinal e invade a hemocele, o sistema imune de *R. prolixus* atua de forma humoral e celular. Dessa forma, estes parasitas após se libertarem do intestino como formas epimastigotas curtas, ao chegarem à hemolinfa, se diferenciam em epimastigotas longas a fim de não serem destruídos pelo sistema imune e poderem interagir com os diversos órgãos do inseto. As formas epimastigotas curtas que conseguem chegar à hemolinfa são destruídas por ação do sistema imune do inseto, portanto o número de parasitas presentes é drasticamente reduzido (WATKINS, 1971; GOMES et al., 1999). De acordo com estas informações, nossos resultados não podem ser comparados com os de FELLET et al., (2014), uma vez que a injeção intracelomática aumenta de forma drástica a quantidade de parasitas que poderão interagir com os diferentes tecidos do inseto, potencializando a ação patogênica de *T. rangeli*. Este tipo de infecção pode ativar vias imunes ou gerar respostas imunes diferentes das que seriam obtidas por uma infecção exclusivamente oral.

Segundo Medeiros et al., (2010), o desafio imune por fungos como *Aspergillus niger* e outros microorganismos, podem promover um processo degenerativo

em células de ovários de *R. prolixus*, chamado de atresia. Em nosso trabalho também foram observadas alterações nas células ovarianas das fêmeas de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli*. Nossos resultados demonstraram desorganização nuclear, presença de vacúolos citoplasmáticos provavelmente autofágicos, indicando um processo degenerativo, sugestivo de atresia. HOPWOOD, AHMED et al., (2001), demonstraram que a infecção com o *Plasmodium* em fêmeas de *Anopheles stephensi* causa uma reabsorção das células foliculares nos ovariolos e conseqüentemente uma redução do investimento na produção de ovos, ligada a alguma molécula sinalizadora e moduladora, liberada pelo parasita ou hospedeiro, visto que o parasita ainda se encontra no mesentêro no início da reabsorção. Eicosanoides parecem estar relacionados à regulação da absorção por endocitose de proteínas como *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP), vitelogenina e outras proteínas que compõem o vitelo em células ovarianas (MEDEIROS et al., 2002). Dessa forma, embora não tenhamos encontrado o parasita nos ovários das fêmeas infectadas, o parasita pode estar modulando o ovário de forma extra ovariana, afetando os eicosanoides, por exemplo, e levando à degeneração nuclear das células ovarianas e conseqüentemente, à redução do número de ovos observada nos insetos infectados por via oral.

Segundo LEWIS et al., (2002) os parasitas podem alterar o comportamento do hospedeiro como forma de aumentar suas chances de sucesso para completar o seu ciclo de vida ou a alteração comportamental pode ser apenas uma tentativa do hospedeiro de eliminar o parasita. Essas alterações podem interferir no sucesso reprodutivo do inseto vetor. De acordo com os nossos resultados e os dados da literatura aqui discutidos, podemos dizer que *T. rangeli* se encaixa no modelo de parasitismo que preconiza que a redução do sucesso reprodutivo pode ser apenas uma resposta aos danos causados pelo parasita ao sistema do hospedeiro, uma vez que o objetivo final do seu ciclo de vida é chegar às glândulas salivares do inseto vetor adquirindo a possibilidade de transmissão e dessa forma, a perpetuação da espécie.

Vários estudos poderão ser realizados a partir de nossas observações. Pretendemos, como perspectivas futuras, investigar a concentração de vitelogenina e vitelina nos ovários dos insetos infectados e aprofundar os estudos do processo atresia encontrado nas células ovarianas de *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*.

## 6. CONCLUSÕES

- O tempo médio do comportamento de cópula das fêmeas de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* foi reduzido de forma significativa.
- O intervalo pré-cópula e o comportamento de guarda não tiveram seu tempo significativamente alterado pela infecção.
- A capacidade reprodutiva foi alterada: a média de ovos de fêmeas infectadas foi bem menor comparada às fêmeas do grupo controle.
- A fertilidade dos ovos não foi alterada, uma vez que o número médio de ninfas não foi alterado de forma significativa.
- Células dos ovários de fêmeas de *R. prolixus* infectadas com *T. rangeli* demonstraram desorganização nuclear, indicando um processo degenerativo, sugestivo de atresia.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIZER, Sonia M.; OBERHAUSER, Karen S. Effects of the Protozoan Parasite *Ophryocystis elektroscirrha* on the Fitness of Monarch Butterflies (*Danaus plexippus*). **Journal of invertebrate pathology**, v. 74, n. 1, p. 76-88, 1999.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. IV-A reconsideration of its systematic position. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 4, p. 405-415, 1982.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. VII-Its effect on the survival of infected triatomine bugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 2, p. 249-255, 1984.
- ATELLA, Georgia C. et al. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 405-430, 2005.
- BEN-YAKIR, D. Growth retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host against *Nocardia (Rhodococcus) rhodnii* **Journal of insect physiology**, v. 33, n. 6, p. 379-383, 1987.
- BONHAG, Philip F. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. **Annual review of entomology**, v. 3, n. 1, p. 137-160, 1958.
- BOTTO-MAHAN, CAREZZA; OSSA, Carmen Gloria; MEDEL, Rodrigo. Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. **Physiological Entomology**, v. 33, n. 1, p. 25-30, 2008.
- BUZZI, Z J.; MIYAZAKI, R. D.- Entomologia didática 5ªed. Curitiba, Ed. UFPR, 2002.pp 535
- CARAYON, J. 1966. Traumatic insemination and the paragenital system. Em: Monograph of cimicidae, ed.R.L.Usinger, pp. 81 166. Entomological Society of America, College Park, MD.
- CHAPMAN RF. The insects: structure and function. 4 edition. Cambridge University Press, UK. 1998.
- CUBA CUBA, César A. Review of biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 1998.
- DAFLON-TEIXEIRA, Natália Faria et al. Influence of blood meal and mating in reproduction patterns of *Triatoma brasiliensis* females (Hemiptera: Reduviidae) under

- laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1031-1034, 2009.
- DAVEY, K. G. The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus* Stal. **J. exp. Biol.**, v. 35, p. 694-701, 1958.
- DAVEY, K. G. Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 103-108, 1987.
- DE DIEGO, José Antonio. *Trypanosoma (HERPETOSOMA) rangeli*: certezas y dudas de una infección silenciosa. **Acta Biológica Venezolana**, v. 26, n. 2, p. 11-22, 2012.
- De mattos, DP. **Interação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli*: Avaliação do Sistema de Defesa Celular e Humoral e Microbiota Intestinal**. 2014 p.123. Dissertação de Mestrado em Paristologia, .Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology international**, v. 52, n. 4, p. 299-307, 2003.
- DE OLIVEIRA, Marco Antonio; DE SOUZA, Wanderley. An Electron Microscopic Study of Penetration by *Trypanosoma rangeli* into Midgut Cells of *Rhodnius prolixus*. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 77, n. 1, p. 22-26, 2001.
- EICHLER, S.; SCHAUB, G. A. 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**, v. 44, n. 2, p. 131-140, 1998.
- EICHLER, S.; SCHAUB, G. A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. **Experimental parasitology**, v. 100, n. 1, p. 17-27, 2002.
- FELLET, Maria Raquel et al. Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105255, 2014.
- FOLLY, Evelize et al. *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 310, n. 2, p. 555-561, 2003.
- FRINGS, Hubert; FRINGS, Mable. Uses of sounds by insects. **Annual Review of Entomology**, v. 3, n. 1, p. 87-106, 1958..
- FUTUYMA, Douglas J. *Biologia evolutiva*. Tradução Iulo F. Afonso. 3. Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC-Editora, 2009. 830p.
- GARCIA, E. S. et al. *Rhodnius prolixus* Salivary Antihemostatic Components Decrease with *Trypanosoma rangeli* Infection. **Experimental Parasitology**, v. 78, n. 3, p. 287-293, 1994.

- GARCIA, Eloi S.; MACHADO, Evandro MM; AZAMBUJA, Patrícia. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **Experimental parasitology**, v. 107, n. 1, p. 31-38, 2004.
- GILLOTT, C.- Entomology. 3<sup>a</sup> ed.,. Saskatoon, Springer, 2005. 831pp
- GOMES, S. A. O. et al. *Rhodnius prolixus* Infected with *Trypanosoma rangeli* *In Vivo* and *in Vitro*. Experiments. **Journal of invertebrate pathology**, v. 73, n. 3, p. 289-293, 1999.
- GOMES, S. A. O. et al. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 79, n. 2, p. 86-92, 2002.
- GOMES, S. A. O. et al. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli* **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 9, p. 829-837, 2003.
- GÓMEZ, Ivonne. Nuevas observaciones acerca de la acción patógena del *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 sobre *Rhodnius prolixus* Stal 1859. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* v. 9, n 1, p.5-10, (1967).
- GRAZIA, J.; FERNANDES, J.A.M.- HEMIPTERA – SUBORDEM HETEROPTERA Linnaeus, 1758. In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B; CASARI, S.A.- *Insetos do Brasil (Diversidade e taxonomia)*. Ribeirão Preto, Holos, 2012, pp 369-405.
- GREWAL, Manohar Singh. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. **Experimental parasitology**, v. 6, n. 2, p. 123-130, 1957.
- GUHL, Felipe; VALLEJO, Gustavo Adolfo. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.
- GULLAN, Penny J.; CRANSTON, Peter. *The insects: an outline of entomology*. 3<sup>a</sup>ed., California, Blackwell, 2005. pp. 505.
- GURGEL-GONÇALVES, Rodrigo et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 323-330, 2004.
- GUTIERREZ-FONSECA, Pablo E. Capítulo 6: Plecoptera. *Rev. biol. trop*, San José, 2013.
- HAMILTON, Patrick B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393-1404, 2004.
- HARRINGTON, J. S. Synthesis of thiamine and folic acid by *Nocardia rhodnii*, the micro-symbiont of *Rhodnius prolixus*. **Nature**, v.188, n 4755, p. 1027-1028, 1960.

- HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitology research**, v. 76, n. 4, p. 311-318, 1990.
- HOPWOOD, JANE A. et al. MALARIA-INDUCED APOPTOSIS IN MOSQUITO OVARIES A MECHANISM TO CONTROL VECTOR EGG PRODUCTION. **The Journal of experimental biology**, v. 204, n. 16, p. 2773-2780, 2001.]
- HURD, H. Parasite manipulation of insect reproduction: who benefits?. **PARASITOLOGY-CAMBRIDGE-**, v. 116, p. S13-S22, 1998.
- HURD, Hilary; ARDIN, Richard. Infection increases the value of nuptial gifts, and hence male reproductive success, in the *Hymenolepis diminuta*-*Tenebrio molitor* association. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 2, p. S172-S174, 2003.
- HURD, Hilary; PARRY, G. Metacestode-induced depression of the production of, and response to, sex pheromone in the intermediate host *Tenebrio molitor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 1, p. 82-87, 1991.
- JENSEN, Cord; SCHAUB, Günter A. Development of *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) in *Triatoma infestans* after vitamin B-supplementation of the blood-diet of the bug. **European journal of protistology**, v. 27, n. 1, p. 17-20, 1991.
- JURBERG, José et al. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 1, p. 111-120, 1986.
- KLOWDEN, Marc J.; KLOWDEN, Marc J. Physiological systems in insects. Access Online via Elsevier, 2007.
- LEWIS, Sara M.; CRATSLEY, Christopher K. Flash signal evolution, mate choice, and predation in fireflies. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 53, p. 293-321, 2008..
- LIMA, Marli Maria; JURBERG, Pedro; ALMEIDA, Josimar Ribeiro de. Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease: I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm-1835) in the laboratory. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 1986.
- LUTZ, Douglas A.; HUEBNER, Erwin. Development and cellular differentiation of an insect telotrophic ovary (< i> *Rhodnius prolixus*</i>). **Tissue and Cell**, v. 12, n. 4, p. 773-794, 1980.
- MAIA DA SILVA, F. et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 05, p. 549-561, 2004.

- MANRIQUE, Gabriel; LAZZARI, Claudio R. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 629-633, 1994.
- MARQUES, M.D. HEMIPTERA – Anatomia e Fisiologia, In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B; CASARI, S.A.- Insetos do Brasil (Diversidade e taxonomia). Ribeirão Preto, Holos, pp 33-80, 2012. MARQUES-----Insetos do Brasil.
- MASLOV, Dmitri A.; PODLIPAEV, Sergei A.; LUKES, Julius. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
- MATTHEWS, Robert. W; MATTHEWS, Janice. R. *Insect Behavior*. 2. ed. New York: Springer, 2010. 514p.
- MAYR, E.R.- Populações espécies e evolução. São Paulo.Ed. da Universidade de São Paulo. 1977, 485pp.
- MELLO, C. B. et al. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 65, n. 3, p. 261-268, 1995.
- MEDEIROS, Marcelo N, Oliveira, D. M., Paiva-Silva, G. O., Silva-Neto, M. A., Romeiro, A., Bozza, M., ... & Machado, E. A. The role of eicosanoids on *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) endocytosis by *Rhodnius prolixus* ovaries. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 5, p. 537-545, 2002.
- MEDEIROS, Marcelo N, Ramos, I. B., Oliveira, D. M., da Silva, R. C., Gomes, F. M., Medeiros, L. N., ... & Machado, E. A. Microscopic and molecular characterization of ovarian follicle atresia in *Rhodnius prolixus* Stahl under immune challenge. **Journal of insect physiology**, v. 57, n. 7, p. 945-953, 2011.
- MONROY, Carlota et al. Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: infection rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 305-310, 2003.
- OLIVEIRA, Tiago G et al. Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1057-1060, 2010.
- OPPERDOES, Fred R. The Trypanosomatidae: amazing organisms. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 145-146, 1994.
- ORMEROD, W. E. The effect of *Trypanosoma rangeli* on the concentration of amino acids in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n. 2, p. 247-255, 1967.
- PAIM, Rafaela MM et al. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* Hemiptera; Reduviidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 3, p. 229-236, 2013.

- PAULA, A.S., DIOTAIUTI, L., SCHOFIELD, C.J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mol. Phylogen. Evol.** 35: 712–718, 2005.
- PIRES, Herton Helder Rocha et al. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 295-300, 2004.
- PIRES, Herton Helder Rocha et al. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 295-300, 2004.
- PONTES, Gina Barcelos. **Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae); Sexual behavior of *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae)**. 2010. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz (Centro de Pesquisas René Rachou), Belo Horizonte
- PULIDO, Ximena Carolina; PÉREZ, Gerardo; VALLEJO, Gustavo Adolfo. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1 (+) and KP1 (-) subpopulations' vectorial ability. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 172-179, 2008.
- RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B; CASARI, S.A.- Insetos do Brasil (Diversidade e taxonomia). Ribeirão Preto, Holos, 2012, pp 369-405
- REINHARDT, Klaus; SIVA-JOTHY, Michael T. Biology of the bed bugs (Cimicidae). **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 351-374, 2007.
- RIVNAY, E. The tropisms effecting copulation in the bed bug. **Psyche**, v. 40, n. 4, p. 115-120, 1933.
- ROJAS, Julio C. et al. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compounds of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 2, p. 256-265, 2002.
- ROSADO-NETO, Germano H.; SANTOS, Geane Brizzola dos. The elytero-tergal stridulatory apparatus of the genus *Bondarius* Rosado-Neto (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 337-338, 2010.
- SÁNCHEZ, I. P. et al. Inmunidad natural de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) frente a la infección con *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* KP1 (-) aislados de *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. **Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas**, v. 17, p. 108-18, 2005.
- SCHAUB, G. A. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. **Parasitology Today**, v. 10, n. 12, p. 463-468, 1994.
- SCHENONE, Hugo. Xenodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 289-294, 1999.

- SCHILMAN, P.E.; LAZZARI, C. R.; MANRIQUE, G.- Comparison of disturbance stridulations in five species of triatominae bugs. **Acta Tropica**, v. 79, n. 2, p. 171-178, 2001.
- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2, p. 88-100, 2009.
- SHAPIRO, Theresa A.; ENGLUND, Paul T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 117-143, 1995.
- SHOREY H.H. Manipulation of insect pests of agricultural crops. In: Shorey HH, McKelvey JJ, eds. Chemical control of insects behaviour. Theory and application. John Wiley & Sons, p 353-367. New York. 1973.
- SIMMONS, L. W., 2001, Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in Insects, Princeton University Press, Princeton.
- SNODGRASS, R. E. Principles of insect morphology. Principles of Insect Morphology. 1935.
- SONG N, LIANG A-P, BU C-P A Molecular Phylogeny of Hemiptera Inferred from Mitochondrial Genome Sequences. **PLoS ONE** 7(11): e48778, 2012.
- SOTO-VIVAS, Ana et al. Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. **Acta zoológica mexicana**, v. 27, n. 1, p. 87-102, 2011.
- STEVENS, J. R. et al. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 749-757, 1999.
- STUTT, A. D.; SIVA-JOTHY, Michael T. Traumatic insemination and sexual conflict in the bed bug *Cimex lectularius*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5683-5687, 2001.
- TAKLE, Garry B. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 51, n. 1, p. 64-72, 1988.
- TOBIE, Eleanor Johnson. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. **The Journal of parasitology**, p. 837-841, 1965.
- TOBIE, Eleanor Johnson. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 1, p. 118-125, 1970. VALLEJO, Gustavo Adolfo et al. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. **Biomédica**, v. 27, n. 1 esp, p. 110-8, 2007.
- VIGODER, Felipe M. et al. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and

Neiva, 1912) complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 734-739, 2010.

VIRANT-DOBERLET, Meta; COKL, Andrej. Vibrational communication in insects. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 121-134, 2004.

VITTA, A. C.R; LORENZO, Marcelo G. Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 4, p. 789-795, 2009.

WATKINS, Rosalie. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 17, n. 1, p. 59-66, 1971.

WATKINS, Rosalie. *Trypanosoma rangeli* Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 17, n. 1, p. 67-71, 1971.

APA

WHITTEN, M. M. A. et al. Role of Superoxide and Reactive Nitrogen Intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/ *Trypanosoma rangeli* Interactions. **Experimental parasitology**, v. 98, n. 1, p. 44-57, 2001.

WHITTEN, Miranda et al. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli* T. cruzi and bacterial cell wall components. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 5, p. 440-452, 2007.

YURCHENKO, Vyacheslav; KOLESNIKOV, A. A.; LUKES, J. Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. **Folia Parasitologica**, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2000.

ZELEDÓN, RODRIGO; Tripanosomiasis rangeli. **Revista de Biologia Tropical**, Brasil, V.2, n. 2, p. 231-268, 1955.