

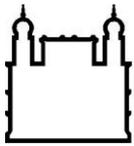
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL DE
Rhodnius prolixus Stål, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)**

THIAGO PEIXOTO MACHADO

Rio de Janeiro
Março de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

THIAGO PEIXOTO MACHADO

Descrição do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Prof. Dr^a. Jacenir Reis Santos Mallet
Prof. Dr^a. Simone Patrícia Carneiro Freitas

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2022

Peixoto Machado, Thiago.

Descrição do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) / Thiago Peixoto Machado. - Rio de Janeiro, 2022. 40 f.

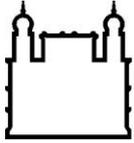
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

Orientadora: Jacenir Reis Santos Mallet.

Orientadora: Simone Patrícia Carneiro Freitas.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Comportamento. 2. Reprodução . 3. Triatomíneo . I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: THIAGO PEIXOTO MACHADO

**Descrição do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859
(Hemiptera, Reduviidae)**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr^a. Jacenir Reis Santos Mallet
Prof. Dr^a. Simone Patrícia Carneiro Freitas**

Aprovada em: 14/03/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Cléber Galvão Ferreira - Presidente (IOC/Fiocruz)

Profa. Dra. Ana Laura Carbajal de la Fuente (CONICET)

Profa. Dra. Elisa Neves Vianna (SVS/Ministério da Saúde)

Prof. Dr. Vinícius Albano Araújo (UFRJ)

Prof. Dr. Carolina Dale Coutinho (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 14 de Março de 2022



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de **Thiago Peixoto Machado**, sob orientação da Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet e da Dra. Simone Patrícia Carneiro de Freitas. Ao décimo quarto dia do mês de março de dois mil vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "**Descrição do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)**", no Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Cleber Galvão Ferreira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Ana Laura Carbajal de La Fuente – CONICET/Argentina, Dr^a. Elisa Neves Vianna – SVS/Min. da Saúde e como suplentes: Dr. Vinicius Albano Araújo – UFRJ/RJ e Dr^a. Carolina Dale Coutinho – IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela ARROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 14 de março de 2022.

Dr. Cleber Galvão Ferreira (Presidente da Banca):

Dr^a. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa):

Dedicado a meus pais e aos Anjos que cercam nossos corações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade em desenvolver minha pesquisa, bem como ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pela compreensão em prorrogar os prazos de defesa.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e suporte na prorrogação dos prazos e bolsas no início da pandemia de Covid-19, quando então as atividades precisaram ser suspensas.

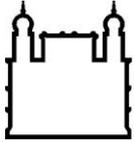
Às minhas orientadoras, Prof^a. Dra. Jacenir Mallet e Prof^a. Dra. Simone Freitas, não só pelo apoio, mas por sua generosidade e sensibilidade humanas, tão importantes em um momento atípico que estamos vivenciando.

A toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera (LIVEDH), por toda a contribuição e parceria nesses meses de elaboração da pesquisa, e também pela ajuda sempre que eu tinha alguma dúvida, seja ela qual fosse. Todos foram fundamentais para que esse trabalho se realizasse. As conversas científicas regadas a café certamente não serão esquecidas. Aos amigos e amigas que fiz, que tiveram passagem em meu coração e que nele ficaram. Por tudo e por tanto, meu obrigado. Aos colegas de classe de mestrado, meu obrigado pelas risadas e companheirismo. Levo com carinho todos os momentos, sejam dentro ou fora da sala. Vocês são um verdadeiro presente!

À minha família, em especial meus pais, pelo apoio e incentivo dos meus estudos, mesmo que não entendiam nada o que é que eu estava fazendo...! Meu muito obrigado.

E sempre, aos Anjos que me cercam, que foram fundamentais para que as coisas não saíssem dos eixos quando parecia que nada daria certo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

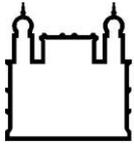
Descrição do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/TESE EM MEDICINA TROPICAL

Thiago Peixoto Machado

O estudo de insetos vetores tem fomentado pesquisas sobre sua cópula, reprodução e comportamentos, uma vez que esta informação está diretamente relacionada com a dispersão e colonização potencial desses animais. O presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, vetor de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas. Foram utilizados 23 casais, alimentados regularmente, obtidos do insetário do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera. Por meio de observação direta, os principais comportamentos, como rejeição da fêmea à cópula, as tentativas do macho, cômte, cópula e comportamento de guarda foram identificados. Em média, a cópula de *R. prolixus* dura 40 minutos. O macho foi sempre o primeiro a cortejar sua parceira, que pode aceitar ou não sua investida. A fêmea pode rejeitar o macho ao estridular, se evadir, movimentar o abdômen ou comprimi-lo no substrato. A maioria das fêmeas aceitou ser guardada após a finalização da cópula. Com o presente estudo pudemos concluir que o comportamento sexual de *R. prolixus* é similar ao de outras espécies do mesmo gênero, e de outras espécies da subfamília Triatominae.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Description of sexual behavior of *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Thiago Peixoto Machado

The study of insect vectors has fostered research on their copulation and reproduction behaviors, since this information is directly related to the dispersion and colonizing potential of these animals. The present work aimed to study the sexual behavior of *Rhodnius prolixus*, vector of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), etiological agent of Chagas disease. Twenty three couples were used, fed regularly, obtained from the insectary of the Interdisciplinary Laboratory of Entomological Surveillance in Diptera and Hemiptera. Through direct observation, the main types of female rejection at copulation, the male's attempts to mate with the same partner, courtship, copulation and guarding behavior were identified. The copulation time of *R. prolixus* was also registered. The mating time of *R. prolixus* was also recorded. On average, the copula of *R. prolixus* lasted 40 minutes. The male has always been the first to court his partner, who may or not accept his advances. The female could reject the male by stridulating, evading, moving her abdomen or pressing him into the substrate. Most deliveries accepted will be kept after the copulation is completed. With the present study we were able to conclude that the sexual behavior of *R. prolixus* is similar to that of other species of the same genus, and of other species of the Triatominae subfamily.

ÍNDICE

RESUMO	III
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Os triatomíneos	12
1.1.1 O gênero <i>Rhodnius</i>	12
1.1.2 O complexo " <i>R. prolixus</i> "	14
1.2 Morfologia reprodutiva	17
1.2.1 Aparelho reprodutor masculino de triatomíneos	17
1.2.2 Aparelho reprodutor feminino de triatomíneos	18
1.3 Biologia reprodutiva	18
1.4 Justificativa	20
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. METODOLOGIA	21
3.1 Obtenção dos espécimes	21
3.2 Alimentação artificial	21
3.3 Cópula e comportamento	22
3.4 Análise de dados	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Descrição do comportamento sexual no período pré-copulatório	25
4.2 Descrição do comportamento sexual no período copulatório	29
4.3 Descrição do comportamento sexual no período pós-copulatório	31
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Rhodnius prolixus</i>	14
Figura 2. Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de triatomíneos.....	15
Figura 3. Foto do sistema reprodutor feminino de um triatomíneo na cavidade abdominal.....	16
Figura 4. Desenho esquemático das placas genitais de ninfas de 5 ^o estágio de triatomíneo.....	20
Figura 5. Foto do procedimento de alimentação artificial.....	21
Figura 6. Esquematização da linha temporal com os parâmetros observados da cópula de <i>R. prolixus</i>	22
Figura 7. Foto do espermatóforo retirado da bolsa copulatória da fêmea por meio de dissecação.....	23

1. INTRODUÇÃO

A ordem Hemiptera (Linnaeus, 1758) – do grego “*hemi*” (= metade) e “*pteron*” (= asa) –, é definida por insetos que não possuem palpo maxilar e labial, apresentando em seu lugar uma única estrutura, o rostro, que comprime todas as peças bucais – maxila, mandíbula e lábio. Esta característica os capacita para a obtenção e extração de fluidos, e, por isso, hemípteros são comumente chamados de insetos sugadores (Grimaldi & Engel, 2005).

A diversidade de alimentações destes insetos está atrelada ao modo como eles obtêm seus nutrientes, principalmente com a formação anatômica de suas peças bucais, o que afeta de sobremodo a maneira como se relacionam com o meio em que vivem. Por exemplo, insetos fitófagos que obtêm seu alimento diretamente da seiva de plantas, possuem rostro alongado com quatro segmentos; indivíduos predadores apresentam um rostro mais robusto, curvo, com quatro segmentos visíveis, enquanto aqueles que apresentam dieta hematófaga possuem rostro retilíneo com quatro segmentos visíveis (Galvão, 2015).

Hemiptera é uma ordem de insetos paurometábolos, sendo composta pelas subordens Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas), Sternorrhyncha (psílídeos, pulgões, cochonilhas e as chamadas moscas brancas), Coleorrhyncha e Heteroptera (percevejos verdadeiros) (Weirauch & Schuh, 2011).

Dentre os Heteroptera, há relatos ocasionais de ataques de insetos predadores a seres humanos, causando dor ou sensação de queimação, presumivelmente resultado da ação de sua saliva que normalmente digerem materiais de plantas ou de outros insetos (Myers, 1929 e Schaefer, 2003 *apud* Krinsky, 2019). No entanto, são os insetos hematófagos que embasam as maiores discussões para a saúde e bem estar de seres humanos e outros animais, devido aos patógenos que eles transmitem, bem como pelo incômodo de suas picadas. Dentro deste contexto, os hemipteras hematófagos de importância médico-veterinária de maior relevância são os triatomíneos e os cimicídeos (percevejos de cama) (Krinsky, 2019).

1.2 OS TRIATOMÍNEOS

Os membros da família Reduviidae são comumente tratados na literatura como “percevejos assassinos” pela predação a outros insetos. Os representantes da subfamília Triatominae diferenciam-se de outros reduvídeos pela sua notável hematofagia obrigatória. Esta característica da sua biologia torna os triatomíneos veículos de

patógenos por estarem em constante contato com diferentes hospedeiros em diferentes nichos, pondo-os no centro de debates sobre saúde e a epidemiologia de agravos, em especial a da doença de Chagas, na qual estes insetos atuam como vetores biológicos do protozoário *Trypanosma cruzi* Chagas, 1909.

A subfamília Triatominae é constituída de 18 gêneros, distribuídos em cinco tribos, com 157 espécies descritas (Alevi et al 2021, Galvão 2021, Dale et al. 2021) (Tabela 1). Os gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* apresentam importância medicoveterinária pela sua participação na dinâmica de transmissão de tripanossomatídeos. Conforme Almeida et al (2015) comentaram, admite-se que os triatomíneos sejam capazes de habitar todos os ecossistemas equatoriais, tropicais e subtropicais. A maioria das espécies habita regiões neotropicais, embora algumas possam ser encontradas nos Estados Unidos, centro-sul da África, sudeste da Ásia e norte da Austrália. Popularmente conhecidos como barbeiros, chupão ou procotó no Brasil, estes insetos recebem outros nomes vulgares de acordo com os países em que são encontrados.

Tabela 1: Classificação da subfamília Triatominae

Tribos	Gêneros	Número de espécies
Alberproseniini	<i>Alberprosenia</i>	2
Bolboderini	<i>Belminus</i>	9
	<i>Bolbodera</i>	1
	<i>Microtriatoma</i>	2
	<i>Parabelminus</i>	2
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	2
Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	3
	<i>Rhodnius</i>	22
	<i>Dipetalogaster</i>	1
Triatomini	<i>Eratyrus</i>	2
	<i>Hermanlentia</i>	1
	<i>Linshcosteus</i>	6
	<i>Mepraia</i>	3
	<i>Nesotriatoma</i>	3
	<i>Paleotriatoma</i>	1
	<i>Panstrongylus</i>	15
	<i>Paratriatoma</i>	1
	<i>Triatoma</i>	81
	Total	18

Em território brasileiro, os triatomíneos distribuem-se por diferentes biomas, cujos ecótopos participam como fatores na construção do perfil eco-epidemiológico da doença de Chagas (Forattini 1980 apud Almeida et al, 2015). No ambiente silvestre, os triatomíneos ocupam diferentes nichos, muitas vezes estabelecendo uma relação estreita com o habitat e seus hospedeiros, como é o caso do gênero *Cavernicola* que compartilha o ambiente com morcegos. Miles (2000), em sua revisão sobre os ambientes habitados por triatomíneos, menciona o caso de *Microtriatoma trinidadensis*, especializado em viver sob folhagens de ninhos de *Didelphis* sp. (Marsupialia, Didelphoidea).

Os membros do gênero *Triatoma* são comumente encontrados em complexos rochosos, embora também possam habitar buracos de árvores, como é o caso de *Triatoma sordida* (Stål, 1859), ou tocas de roedores (Miles, 1979). Espécies de *Panstrongylus* estão associadas a buracos e tocas construídas por xenartras, como por exemplo o tatu (*Euphractus sexcinctus*) (Rodrigues e Jansen, 2015) ou então aqueles

formados por raízes de árvores. Por sua vez, *Rhodnius*, tem ligação estreita com palmeiras como ecótopo silvestre primário, embora haja exceções, como por exemplo *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto 1923 que pode habitar bromélias (Almeida et al, 2015).

Conforme pontuado por Gaunt & Miles (2000), a adaptação especializada das espécies de triatomíneos aos mais diversos nichos propõe uma longa história evolutiva, bem como a expansão recente de algumas espécies ecléticas, assim como o referido autor sugeriu a evolução dos tripanossomatídeos com seus vetores, e estes, por sua vez, com suas fontes alimentares. A hipótese sugerida por Schofield e Dujardin (1999) é a de que reduvídeos predadores se adaptaram a ninhos de vertebrados, que ofereciam abrigo de extremos climáticos, além da oferta constante e abundante da captura de nutrientes de invertebrados. Dentro dos ninhos, a dieta de fluidos desta fauna poderia ser suplementada com sangue de vertebrados, progressivamente de modo que os órgãos envolvidos na extração e armazenamento do produto se tornassem adequadamente adaptados.

O desenvolvimento dos triatomíneos é composto por um ciclo hemimetabólico com ovo, cinco estádios imaturos (ninfas) e adultos no qual o inseto se alimenta de sangue em todas as fases da vida. Os triatomíneos são insetos solenofágicos que retiram o sangue diretamente de vênulas ou arteríolas (Lavoipierre et al, 1959), e a hematofagia é realizada por machos e fêmeas, adultos e jovens. Este atributo de sua biologia é preponderante na epidemiologia da transmissão de tripanossomatídeos (Lazzari, 2015).

1.2.1 O gênero *Rhodnius*

Em 1859, durante suas observações, Stål notou que os espécimes que analisava distinguiam-se de outros triatomíneos por suas cabeças alongadas e pela região de inserção das antenas. O referido autor sugeriu a criação do gênero *Rhodnius*, que primariamente continha apenas duas espécies, *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 como indica a revisão feita por Schofield e Dujardin (1999).

A fauna de *Rhodnius* está distribuída em 28 territórios biogeográficos desde a América Central até o sul do Brasil (Barrett, 1991; Abad-Franch & Monteiro, 2007). Trabalhos anteriores relataram a ocupação de populações silvestres em palmeiras, habitat específico de muitas espécies do gênero (Tonn et al 1976; Miles et al, 1983; Rocha et al, 2001). Os referidos autores relataram a ocorrência do gênero associado com espécies de palmeiras, como mucajá (*Schelea maracaibensis* e *Acrocomia sclerocarpia*), inajá (*Attalea maripa*) e babaçu (*Orbigyna speciosa*).

1.2.2 O complexo “*R. prolixus*”

Há o consenso na literatura da existência do complexo *R. prolixus* dentro do gênero *Rhodnius*, formado por *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus* (Barrett, 1988; Garcia, 1998; Lyman et al, 1999; Monteiro et al, 2000; Monteiro et al, 2001; Monteiro et al, 2002; Feliciangeli, 2002; Pavan & Monteiro, 2007).

A distribuição de *R. prolixus* é ampla, mas descontínua (Schofield e Dujardin, 1999). Esta espécie está adaptada a colonizar residências rurais, e é comum encontrá-la na Venezuela e Colômbia. Ainda de acordo com aqueles autores, a domiciliação da espécie sugere que ela ocorreu de forma discreta em algum momento durante o estabelecimento da colonização européia na Venezuela, no século XVI. A dispersão subsequente pode ter sido mediada pelo transporte passivo dos insetos (Figura 1).

Como Barrett (1988) mencionou em sua publicação, membros do complexo *R. prolixus* frequentemente voam até o interior de residências próximas a vegetação. Em ambiente silvestre, colônias domésticas de *Rhodnius* não são encontradas, mas não é raro que estes insetos voem atraídos pela luz artificial das residências humanas. Trabalhadores também podem ser atacados por triatomíneos quando repousam sob palmeiras, ou mesmo quando estão realizando suas tarefas laborais (Miles et al, 2003).

As populações de *R. prolixus* e *R. robustus* são consideradas espécies crípticas pela similaridade morfológica entre si (Monteiro et al 2000, 2001). Estudos moleculares validaram o status taxonômico de *R. prolixus* (Lyman et al, 1999; Monteiro et al, 2002; Pavan & Monteiro, 2007). Barrett (1988), ao realizar cruzamentos experimentais entre 14 colônias de diferentes regiões, constataram que populações amazônicas exibiam esterilidade parcial em laboratório. Outros parâmetros, como resistência à desidratação (Brito et al, 2019), padrões de locomoção (Pavan et al, 2016), polimorfismo nuclear (Pavan et al, 2013), morfometria de asas (Villegas et al, 2002) e proteínas salivares (Soares et al, 1998) foram estudados afim de cotejar as espécies.

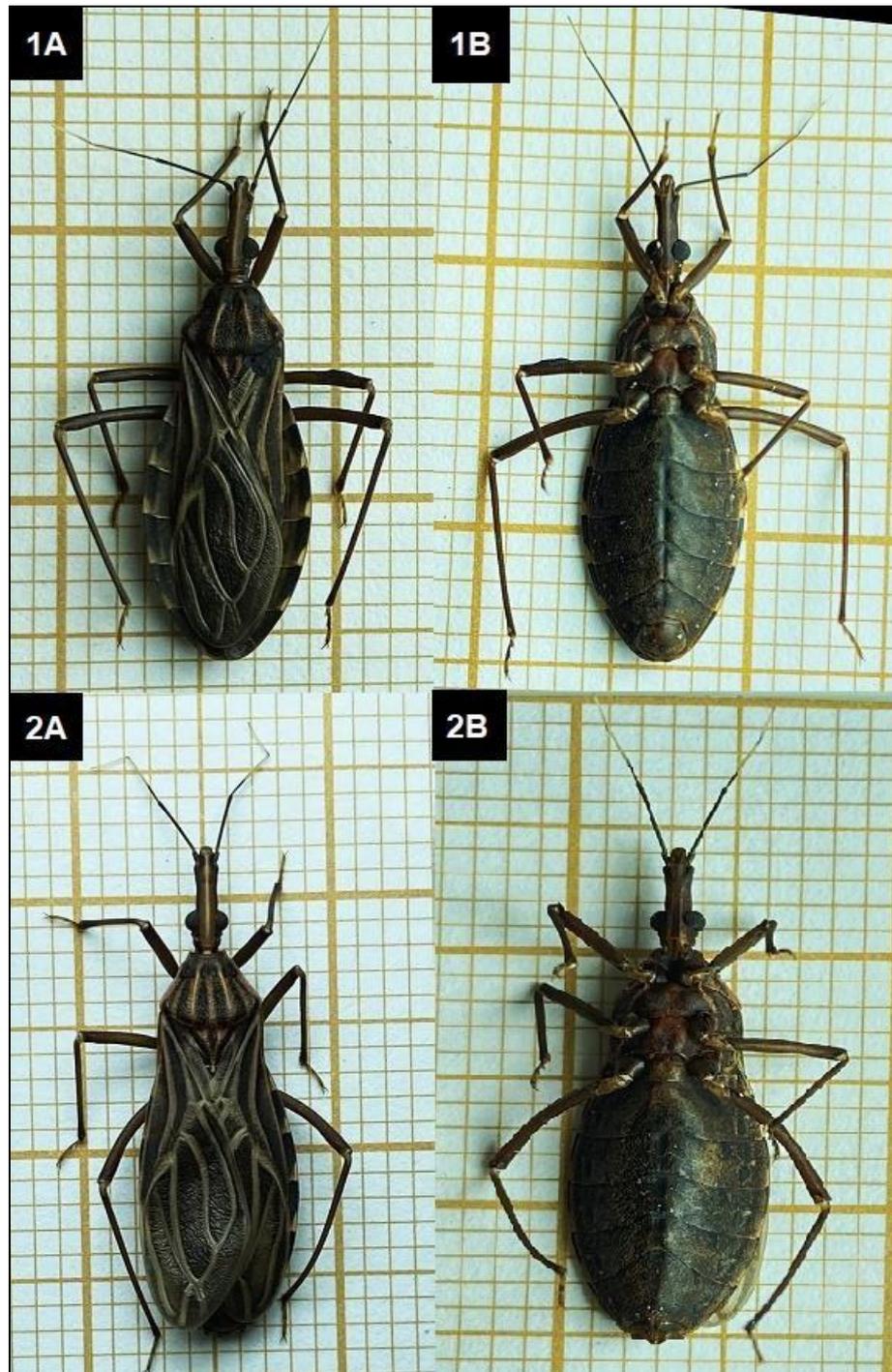


Figura 1: *Rhodnius prolixus*. 1: macho, 2: fêmea. 1A: visão dorsal, 1B: visão ventral, 2A: visão dorsal, 2B: visão ventral. (Imagem: Catarina Macedo)

1.3 MORFOLOGIA REPRODUTIVA

1.3.1 Aparelho reprodutor masculino de triatomíneos

O aparelho reprodutor masculino tem como funções a produção, estocagem e transferência do espermatozoide para a fêmea

Nos triatomíneos, o mesmo é constituído por um par de testículos responsáveis pela produção de espermatozoides, conectados ao ducto ejaculatório pelos vasos

deferentes. As glândulas acessórias estão conectadas aos vasos deferentes, e suas secreções auxiliam o fluido seminal e na produção do espermátóforo (Figura 2). O esperma migra dos testículos para ser armazenado pela vesícula seminal. Isso permite que o macho tenha uma quantidade substancial de esperma estocada para inseminação quando a parceira feminina é localizada e está receptiva para copular (Gillott, 2005).

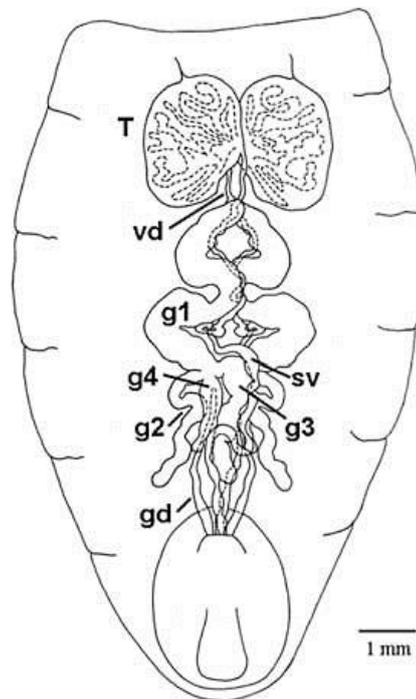


Figura 2: Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de triatomíneos. (T): testículos, (vd): vaso deferente, (sv): vesícula seminal, (g1): glândula acessória I, (g2): glândula acessória II, (g3): glândula acessória III, (g4): glândula acessória IV, (gd): ducto glandular. (Fonte: Freitas et al, 2008. *Animal Biology* 58)

A transferência do material genético masculino é realizada por meio do espermátóforo, estrutura em bastonete translúcida, que armazena a massa compacta de espermatozoides. O espermátóforo possui uma consistência gelatinosa o suficiente para que a fêmea possa descartá-lo assim que os espermatozoides forem completamente estocados na espermateca, porém resistente o suficiente para mantê-los seguros durante seu transporte e permanência na bolsa copulatória (Khalifa, 1950; Davey, 1960; Pereira-Lourenço et al, 2013) (Figura 3).

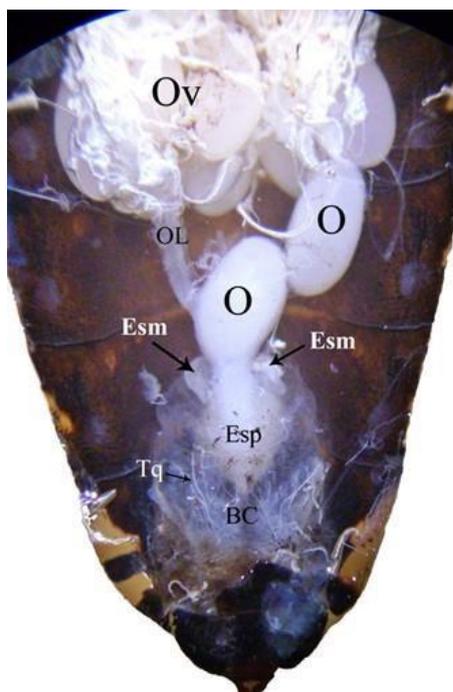


Figura 3: Foto do sistema reprodutor feminino de um triatomíneo na cavidade abdominal. BC: Bolsa Copulatória; Esm: Espermateca; Esp: Espermatóforo; O: Ovo maduro; OL:Oviduto Lateral; Ov: Ovariolo; Tq: Traqueíolas (Imagem: Ariane Pereira-Lourenço).

1.3.2 Aparelho reprodutor feminino de triatomíneos

O aparelho reprodutor feminino é responsável pela produção de ovos, recepção, armazenamento de espermatozoides, incluindo-se a regulação dos eventos que culminarão na fertilização e oviposição (Gillott, 2005).

Os ovócitos são produzidos no germário, contido no par de ovários, e à medida que sofrem maturação, descem pelos ovidutos laterais até atingirem o oviduto comum, quando estão prontos para serem fertilizados. Em par, estão conectadas ao oviduto comum as espermatecas, que armazenam os espermatozoides recebidos dos machos no acasalamento. Durante a passagem pelo oviduto comum, o ovo maduro é fertilizado pelos espermatozoides. Abaixo do oviduto comum surge a bolsa copulatória, ou vagina, região de introdução do edeago e armazenamento temporário do espermatóforo (Figura 3).

1.4 BIOLOGIA REPRODUTIVA

Conforme Chauvin (1977) comentou em sua obra “*A Etologia: Estudo Biológico do Comportamento Animal*”, os animais têm sido tomados como objeto de estudo no campo da Etologia, que se propõe a observar e estudar “uma particularidade de comportamento”. Nas palavras do autor, “compreendeu-se que o nosso único recurso era observar e medir o que ele [*animal*] faz”. Com isso, o estudo do comportamento

dos insetos tem impulsionado a elaboração de trabalhos que permitam a compreensão destes seres com a comunidade em que vivem.

Para que a reprodução ocorra, é necessário que macho e fêmea compartilhem o mesmo espaço de modo que o macho possa transferir seu material genético à vagina feminina (Chapman, 1998). Uma vez que os machos localizam suas parceiras, passam a apresentar comportamentos exibindo suas características, que possibilitarão à fêmea selecionar, dentre aquela comunidade, o espécime com a melhor qualidade genética. Esta qualidade é acessada pela fêmea através dos fenótipos expressos pelos machos, tais como tamanho, asas e peso (Gullan & Cranston, 2005).

Os critérios de seleção pela fêmea dão origem à competição dos machos entre si. A cópula dos insetos, portanto, é mediada pelo conflito de interesses da fêmea em querer diversificar o material genético de sua prole por meio de diferentes parceiros, enquanto os machos querem garantir a paternidade exclusiva da geração seguinte.

Em geral, o macho é quem inicia o contato com a fêmea. Há um investimento energético masculino no sentido de atrair a atenção da parceira para as suas características. Os trabalhos desenvolvidos a partir da década de 80 (Regis, 1985; Lima, 1986, 1986b), utilizando triatomíneos como modelos de estudo, mostraram a relevância de seus dados, uma vez que a observação da cópula e seus comportamentos têm relação com a dispersão e o potencial colonizador destes insetos.

O macho é o primeiro a iniciar as interações com sua parceira, motivado pela oportunidade de copular (Pires et al, 2004; Vitta; Lorenzo, 2009). A fêmea pode rejeitar seu parceiro por meio de diversos comportamentos, tais como: a) estridulação: quando a fêmea fricciona a probóscide no sulco estridulatório; b) evasão: a fêmea escapa do assédio do parceiro, se distanciando deste; c) compressão abdominal: a fêmea comprime o abdômen no substrato de modo a impedir que o macho consiga segurá-la ventralmente, evitando o encaixe das genitálias, e d) movimentação abdominal: o inseto ergue o abdômen de modo a evitar o acesso do macho à genitália feminina Manrique & Lazarri (1994).

O desflorestamento ocasionado ao longo dos últimos anos pode ter impacto direto na dispersão dos vetores, afetando seus habitats naturais, que uma vez fragmentados, os forcem a procurar novos nichos, especialmente aqueles artificiais, criados por meio das ações antrópicas; a escassez e a perda de reservatórios e

hospedeiros naturais também motivam os vetores de tripanossimatídeos quanto a sua dispersão. Tendo em vista este cenário, propomos o estudo e descrição do comportamento sexual de *R. prolixus* como forma de compreensão do seu repertório reprodutivo, considerando seu potencial colonizador e importância medicoveterinária, além de cotejar as informações que a literatura já apresentou acerca do comportamento de outras espécies de triatomíneos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL:

- Descrever o comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* em condições experimentais.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Mensurar a velocidade da tentativa de cópula;
- Quantificar as tentativas do macho em copular com a mesma fêmea;
- Descrever o comportamento de assédio do macho;
- Descrever o comportamento de rejeição da fêmea;
- Mensurar o tempo de cópula;
- Mensurar o tempo pós-copulatório
- Observar aceitação ou rejeição da fêmea em ser guardada

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS CASAIS

Os espécimes de *R. prolixus* utilizados no presente estudos são oriundos das colônias do insetário do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância em Diptera e Hemiptera (LIVEDH), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ, mantidos em condições laboratoriais a 26°C e 80% UR. Ninfas de 5º estágio foram sexadas de acordo com a metodologia proposta por Lent & Jurberg (1968) (Figura. 4), e machos e fêmeas foram separados e mantidos em recipientes de modo a garantir suas virgindades.

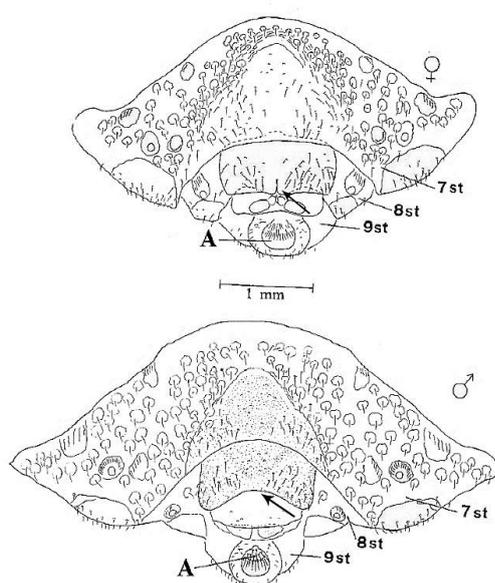


Figura 4: Desenho esquemático das placas genitais de ninfas de 5º estágio de triatomíneo. A: ânus; 7 st: sétimo esternito, 8st: oitavo esternito; 9st: nono esternito; sulco na placa da fêmea (seta); ausência do sulco na placa do macho (seta) (Adaptado de Jurberg et al, 1986).

3.2 ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL

Os espécimes de *R. prolixus* foram alimentados com sangue de ovídeo heparinizado oriundo do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB), da FIOCRUZ/RJ. O sangue foi centrifugado por 10 minutos com 1,500 rotações/min a 10°C. Em seguida, retirou-se o tubo e foi extraído e descartado o plasma sobrenadante. Junto a papa sanguínea foi adicionada solução salina tamponada (0,01M tampão fosfato, 0,15M NaCl, pH 7,2) de modo a homogeneizar e purificar o produto. Este procedimento foi realizado três vezes.

Foi ofertado 10ml de sangue em mamadeiras de vidro, recobertas por luva de látex sem pó lavadas com água e mantido aquecido por meio de banho-maria a 37°C

(Figura 5). Os insetos se alimentaram *ad libitum* por 60 minutos. A alimentação dos triatomíneos foi oferecida semanalmente, e as observação sobre o comportamento sexual só foram realizados após a segunda alimentação do inseto adulto.

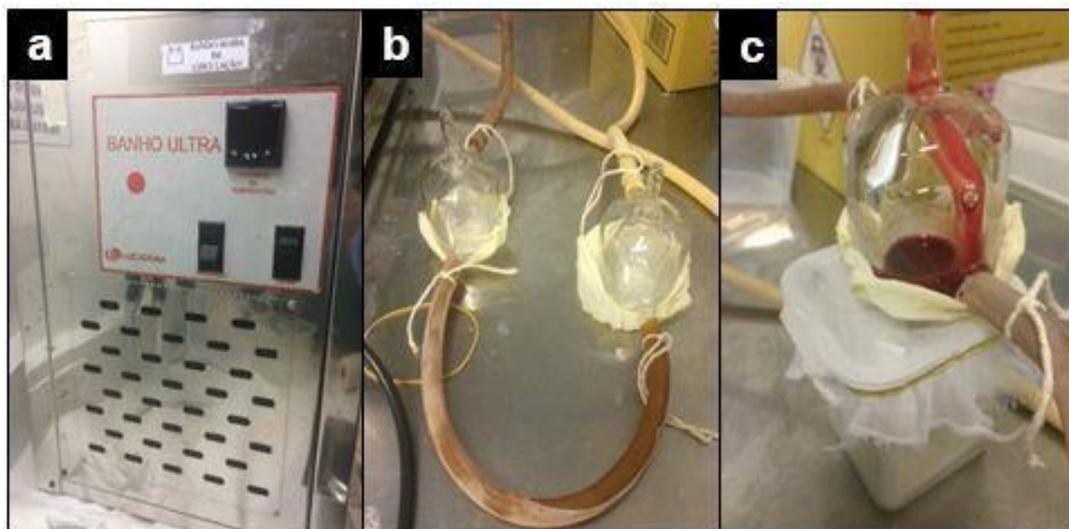


Figura 5: Foto do procedimento de alimentação artificial. a: alimentador em banho-maria; b: mamadeiras de vidro recobertas com luva de látex lavadas; c: alimentação sanguínea da colônia a 37°C.

3.3 CÓPULA E COMPORTAMENTO

Foram selecionados aleatoriamente um macho e uma fêmea, sendo estes depositados em uma placa de Petri 15cm forrada com papel filtro que chamamos de “arena copulatória”. Nesse trabalho, foi considerado como tentativa de cópula aquele comportamento em que o macho tentou encaixar a genitália na fêmea.

A metodologia seguida no presente trabalho foi dividida em uma linha temporal (Figura 6), na qual foram considerados:

1) Período pré-copulatório: compreende todos os comportamentos performados antes da introdução do órgão reprodutor masculino na vagina da fêmea. Nesse período foram observadas as seguintes variáveis:

- Interações: comportamentos que o casal desempenha entre si, antes mesmo do assédio masculino;
- Velocidade da tentativa de cópula: tempo compreendido desde a colocação do casal na arena copulatória até o encaixe do aparelho reprodutor masculino na vagina da fêmea;
- Assédio do macho: comportamentos que o macho desempenha afim de conseguir copular com a fêmea;

- Recusa da fêmea: comportamentos que a fêmea desempenha afim de rejeitar e impedir a cópula com o macho;
 - Tentativas do macho: quantificação das tentativas do parceiro masculino em tentar realizar a posição de cópula na mesma fêmea;
 - Rejeições da fêmea: quantificação das tentativas da parceira feminina afim de rejeitar as tentativas de cruzamento com o macho.
- 2) Período copulatório: espaço de tempo no qual se realiza o cruzamento entre macho e fêmea a partir do encaixe dos órgãos masculinos e femininos até a sua retirada. As variáveis observadas neste período foram as seguintes:
- Tempo de cópula: aquele que se dá enquanto os órgãos reprodutores masculinos e femininos estão encaixados;
 - Comportamento copulatório: comportamentos desempenhados pelo casal durante o momento da copula.
- 3) Período pós-copulatório: a partir da retirada do órgão masculino da vagina feminina e afastamento do casal. Neste período foram observados:
- Comportamento de guarda: performances exibidas pelo macho em relação à fêmea;
 - Tempo de guarda ou pós-cópula: período no qual o macho mantém algum tipo de contato com a fêmea mesmo encerrado o cruzamento.

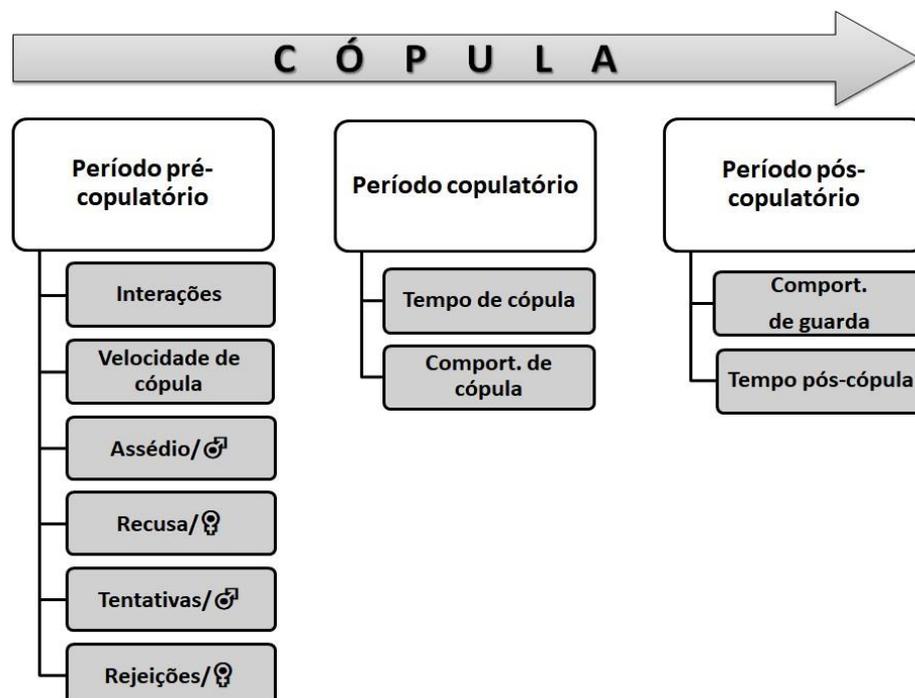


Figura 6: Esquematização da linha temporal com os parâmetros observados da cópula de *R. prolixus*.

3.4 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram submetidos a análise no programa R Studio versão 4.1.1.

4. RESULTADOS

Foram pareados 88 casais, dos quais 23 casais copularam. O cruzamento foi confirmado por meio da observação do espermatóforo, expelido pela fêmea horas após a cópula (Figura 7).



Figura 7: Foto do espermatóforo retirado da bolsa copulatória da fêmea por meio de dissecção. Espf: estrutura do espermatóforo; Espz: espermatozoide. Imagem: Acervo pessoal/Thiago Peixoto Machado.

4.1 Descrição do comportamento sexual no período pré-copulatório

Ao serem colocados na arena copulatória, os casais percorreram a placa de Petri, dando início então às interações entre si, que foram identificadas como toques físicos (de antena e pernas) e passagens tanto por cima como por baixo um do outro (gráfico 1). Estas interações precederam o comportamento de assédio.

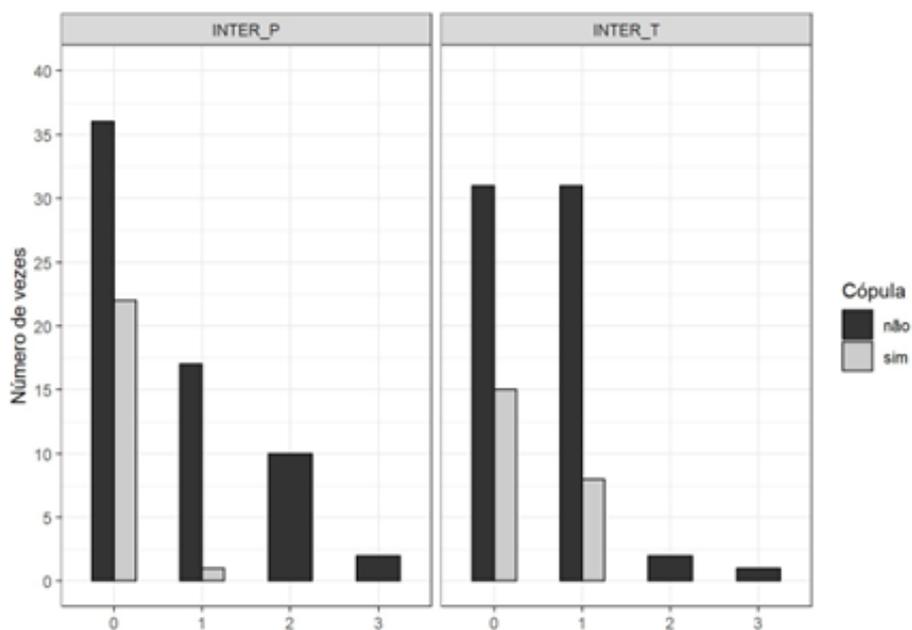


Gráfico 1: Comportamentos de interação entre macho e fêmea e o número de vezes em que cada comportamento foi identificado. INTER_P: interação de passagem, INTER_T: interação de toque.

A interação de passagem entre o casal foi estatisticamente significativa (p valor = 0,01) para o reconhecimento do co-específico, enquanto o toque físico de pernas e antenas não foi significativo.

Os comportamentos de assédio mais performados pelos machos foram agarramento, detenção e montagem. Os machos tentaram copular em média pelo menos uma vez com a mesma fêmea (min = 1, max = 5), e a cópula foi iniciada na primeira tentativa. Machos que não obtiveram êxito em assediar a parceira na primeira abordagem tornaram-se desmotivados a prolongar o contato (Gráfico 2). Embora não tenha sido estatisticamente significativo, machos que não conseguiram copular apresentaram um discreto aumento de comportamentos de assédio em relação aos machos que conseguiram copular. Não houve relação entre algum comportamento de assédio específico e o sucesso copulatório. Além disso, também não foi observada significância entre as tentativas do parceiro masculino em cruzar com a fêmea e cópula.

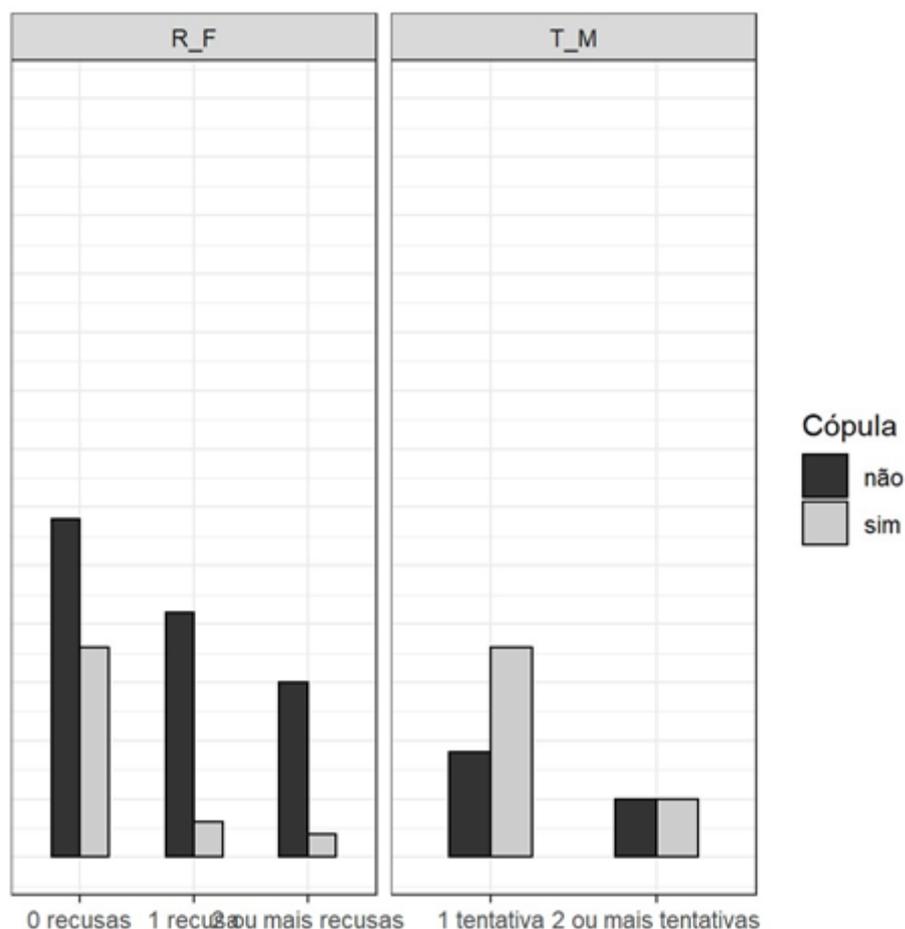


Gráfico 2: Padrão de rejeição da fêmea e investimento do macho. R_F: rejeição da fêmea, T_M: tentativa do macho em copular.

Uma vez identificada a presença da fêmea, o macho iniciou o seu processo de assédio à parceira, considerado como período pré-copulatório. Neste período foram identificados seis diferentes comportamentos de assédio do macho: a) segurar ou tocar a fêmea no abdômen; b) agarrar a fêmea pelo abdômen ou pronoto; c) montar sobre o dorso da fêmea; d) pular sobre a parceira feminina de forma rápida; e) monitorar a parceira, não estando em contato físico com ela, e f) perseguir a fêmea, em resposta a evasão desta (Gráfico 3).

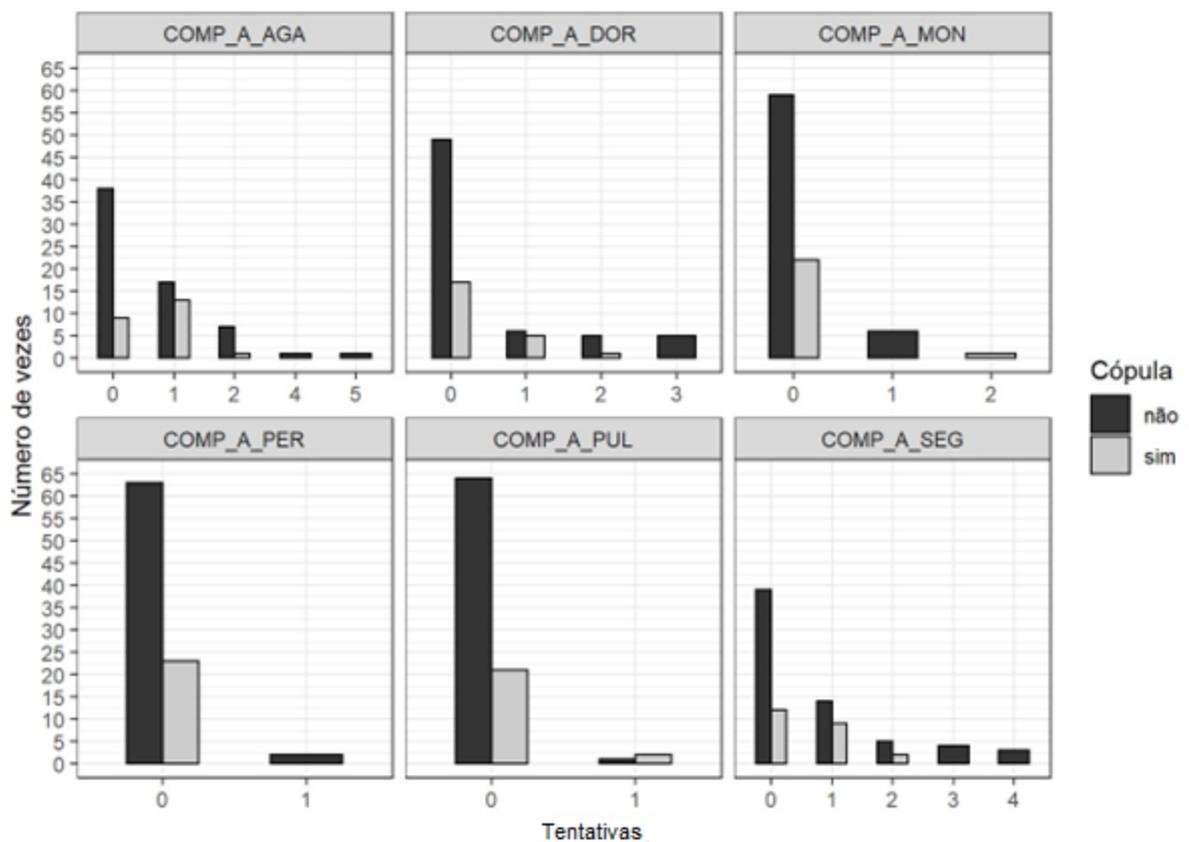


Gráfico 3: Comportamentos de assédio do macho. COMP_A_AGA: agarramento pelo abdômen, COMP_A_DOR: montagem, COMP_A_MON: monitoramento, COMP_A_PER: perseguição, COMP_A_PUL: pulo sobre a fêmea, COM_A_SEG: segura.

Durante o processo de côrte do macho, a fêmea pôde aceitar ou não sua investida. Quando o recusou, distinguimos quatro comportamentos, sendo eles: a) estridulação, a fricção da probóscide no sulco estridulatório; b) evasão, escape ao assédio masculino; c) compressão abdominal, quando a fêmea constribe o abdômen no substrato, e d) movimento abdominal, quando a fêmea ergue o abdômen (Gráfico 4).

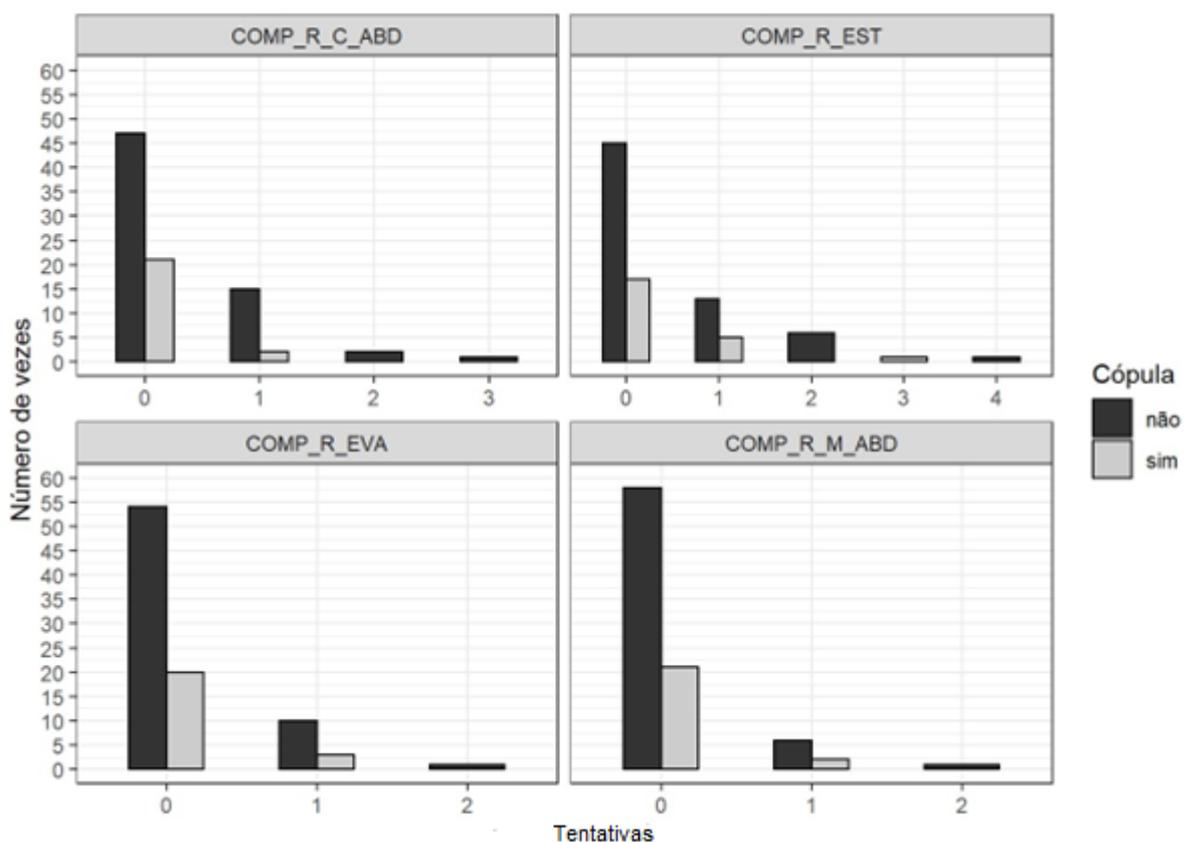


Gráfico 4: Comportamentos de rejeição da fêmea. COMP_R_C_ABD: compressão abdominal, COMP_R_EST: estridulação, COMP_R_EVA: evasão, COMP_R_M_ABD: movimento abdominal.

Os comportamentos de recusa mais performados pelas fêmeas foram: compressão abdominal e estridulação, seguidos de evasão e movimento abdominal (Gráfico 4). As fêmeas rejeitaram seus parceiros pelo menos uma vez em média, oferecendo se não uma resistência total, pelo menos parcial (min = 1, max = 6).

Fêmeas que não copularam apresentaram-se mais resistentes às investidas do parceiro masculino, enquanto fêmeas que estiveram receptivas para o cruzamento não se mostraram resistentes, e portanto, rejeitando menos seus parceiros (Gráfico 2). Os dados obtidos em relação à aceitação e rejeição da fêmea aos seus parceiros foi estatisticamente significativa (p valor = 0,02).

Da entrada na arena copulatório até a tentativa de encaixar a genitália na fêmea, o macho levou em média 3min16s (190s) (min = 23s, max = 18min) (Gráfico 5). Este dado diz respeito apenas aos machos que obtiveram êxito em acessar a genitália feminina, e que conseguiram copular. Os casais que não copularam não foram incluídos na amostragem de tempo.

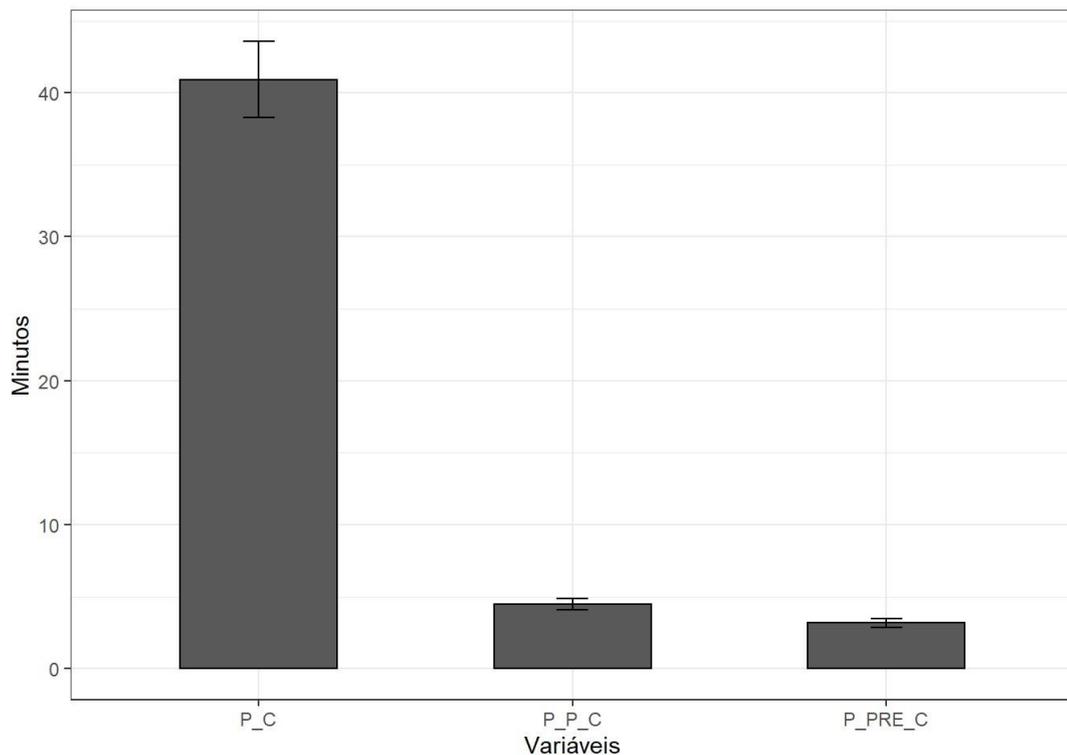


Gráfico 5: Duração de tempo (em minutos) de cada período descritivo do comportamento sexual de *R. prolixus*. P_C: Período copulatório; P_P_C: Período pós-copulatório; P_PRE_C: Período pré-copulatório.

4.2 Descrição do comportamento sexual no período copulatório

Em nossas amostras, identificamos a presença de uma sequência realizada pelo macho afim de encaixar a genitália na vagina feminina, o que optamos chamar em nosso trabalho de 'posição de cópula'. Ao assediar sua parceira feminina (1), o macho montou dorsalmente sobre ela (2), segurando-a pelo pronoto com o primeiro par de pernas (3), e girando 180° dorsolateralmente, apoiando-se no conexivo da fêmea (4), expondo enfim a genitália para introduzir na fêmea (5). Neste momento consideramos iniciada a cópula entre os insetos.

Quando ocorreu o encaixe entre as genitálias masculina e feminina, iniciou-se o período copulatório. Em todas as amostragens os casais permaneceram a maior parte do tempo estáticos, embora tenham sido identificados dois comportamentos relativos ao macho e a fêmea (Gráfico 6). Enquanto estiveram agarrado à parceira feminina, nove machos realizaram movimentos abdominais, pressionando sua genitália na da fêmea. Em algumas amostragens, após decorrido algum tempo, a fêmea se movimentou pela placa de Petri sem, no entanto, perturbar o macho, que permaneceu agarrado a ela com a genitália introduzida. Este comportamento foi observado em 10

fêmeas. Em quatro casais foram identificadas ambas as performances ocorrendo em concomitância.

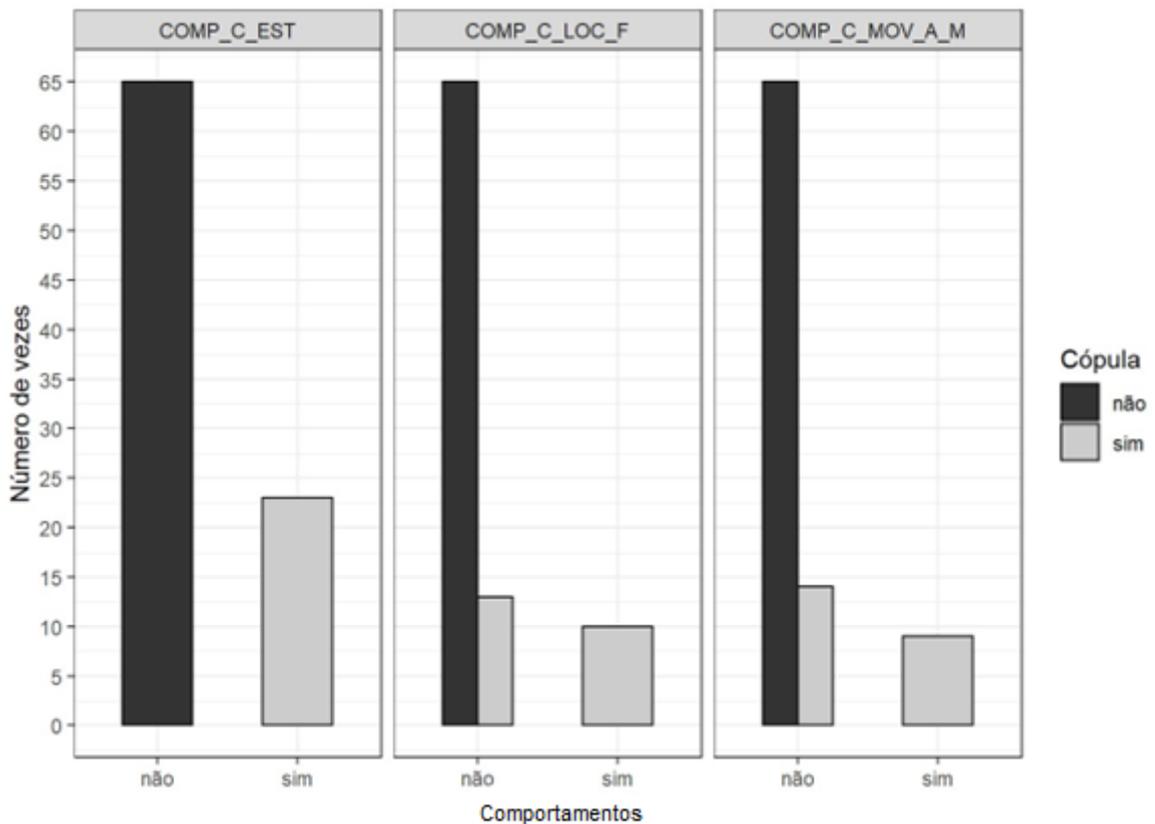


Gráfico 6: Comportamentos de cópula dos casais. COMP_C_EST: casal estático, COMP_C_LOC_F: locomoção da fêmea durante a cópula, COMP_C_MOV_A_M: movimento abdominal realizado pelo macho durante o cruzamento.

Os dados obtidos dos casais pareados indicaram a existência de padrão antenal durante o cruzamento (Gráfico 7). Este padrão apresenta-se de maneira que a antena da fêmea fique apontada para cima em um ângulo aproximado de 90°, enquanto o do macho permanece na mesma posição, porém para baixo. Este padrão foi observado em 18 casais.

Neste experimento, o tempo de cópula de *R. prolixus* foi de 40min9s (2,455s) em média (min = 14 min, máx = 1h34min50s) (Gráfico 5).

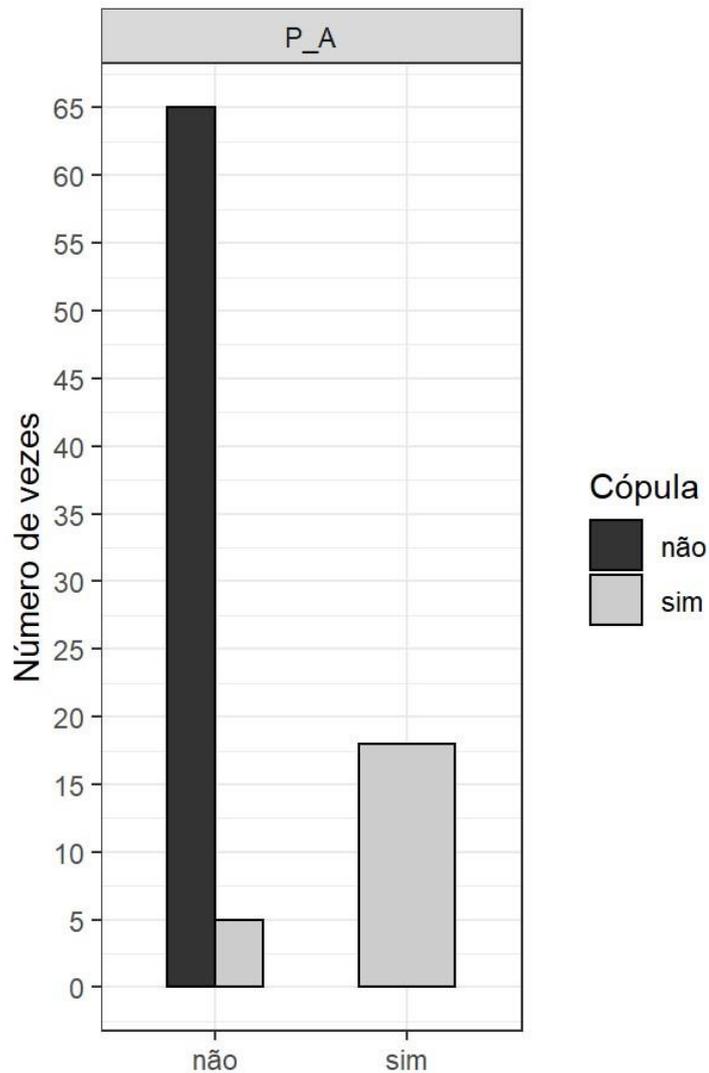


Gráfico 7: Padrão antenal identificado no casal durante a realização da cópula.

4.3 Descrição do comportamento sexual no período pós-copulatório

A cópula foi finalizada com a retirada da genitália masculina da feminina, dando início ao período pós-copulatório, ou de guarda, momento no qual o macho ainda se manteve em contato com a fêmea. Em nossos dados, observamos que os machos exibiram três performances que ainda o vincularam fisicamente à parceira. São eles: a) o macho se manteve agarrado à fêmea, mantendo a posição de cópula, mas com o aparelho reprodutor já retirado; b) a fêmea foi dominada por seu parceiro, que permaneceu sobre ela, segurando-a pelo pronoto; c) o casal se separou fisicamente, mas o macho permaneceu próximo à parceira, mantendo uma postura de vigilância. Em nossas amostragens, a maioria dos machos guardou sua parceira (Gráfico 8).

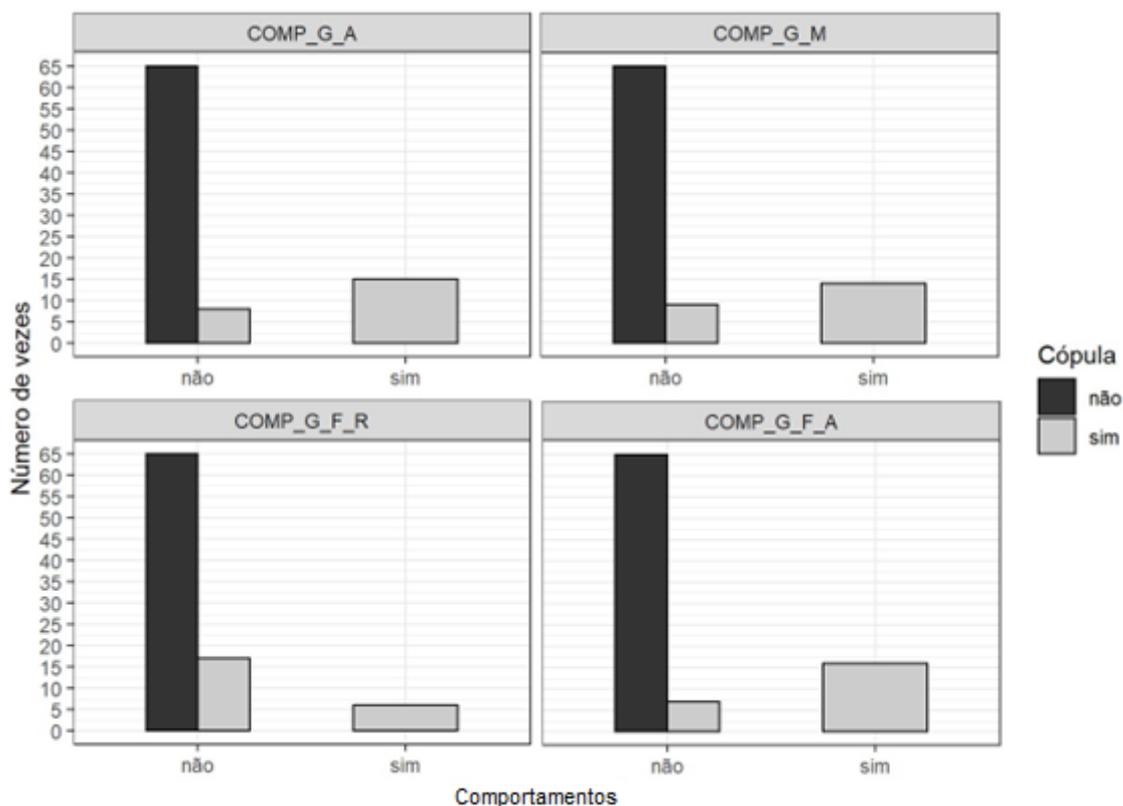


Gráfico 8: Comportamentos pós-copulatórios exibidos pelo casal. COMP_G_A: macho agarrado à parceira, COMP_G_M: monitoramento da fêmea pelo macho, COMP_G_F_R: fêmea rejeitou ser guardada pelo macho, COMP_G_F_A: fêmea aceitou ser guardada pelo macho.

Em resposta à guarda do macho, 16 fêmeas aceitaram o controle de seu parceiro após a finalização da cópula, enquanto seis rejeitaram ser guardadas. Este comportamento de rejeição à guarda do macho foi demonstrada por meio de evasão, quando a fêmea se afastou parcial ou totalmente do macho.

Neste experimento, o tempo de guarda de *R. prolixus* foi de 4min4s em média (min = 40s, máx = 12min) (Gráfico 5).

5. DISCUSSÃO

O comportamento sexual de triatomíneos foi descrito anteriormente por diferentes trabalhos (Regis, 1985; Lima, 1986, 1986b; Rojas et al, 1990; Rojas & Cruz-Lopez, 1992; Manrique & Lazzari, 1994; Garcia-Perez et al, 1997; Pires et al, 2004; Crespo & Manrique, 2007; Daflon-Teixeira et al, 2009; Vitta & Lorenzo, 2009; Manrique & Lorenzo, 2012; Pereira-Lourenço et al, 2013; Machado, 2014), que ao observarem diferentes espécies, concluíram que o macho foi o primeiro a iniciar o contato com seu par. Em nosso trabalho com *R. prolixus*, também registramos comportamento

semelhante ao descrito na literatura, o que atende às expectativas, uma vez que os estudos empíricos de comportamento reprodutivo animal estão em consenso de que na maioria das populações, foi o macho que tomou a iniciativa de entrar em contato com a fêmea (Gillot, 2005).

Assim que os casais eram colocados na arena copulatória, pudemos observar o que chamamos de interações entre os pares, identificados por meio de toques físicos de antenas, pernas e passagens por cima e por baixo do corpo do coespecífico. Acreditamos que estes comportamentos possam estar envolvidos na identificação de um coespecífico, uma vez que a fêmea também participou destas interações. Em favor desta hipótese, houve casais que não copularam que também interagiram fisicamente. Em conflito a esta proposta, machos que interagiram fisicamente com suas parceiras as assediaram em sequência. Houve o registro de casais que não interagiram e o macho não assediou a fêmea ($n = 5$). Este desestímulo dos pares parece ser uma exceção. Os dados obtidos são insuficientes, portanto, para afirmar se estas interações foram de natureza social, ou seja, aquela de reconhecimento de um coespecífico, ou de cortejo sexual, no qual o macho se valeria de exibição fenotípica. Em outro trabalho, os pares de *T. gerstaeckeri* entram em contato corporal e tocam as antenas (Garcia-Perez et al, 1997), no entanto, os autores sugeriram que os machos detectaram suas parceiras acidentalmente.

Em nossos experimentos, tivemos a oportunidade de descrever os comportamentos de assédio do parceiro masculino ao identificar a fêmea. Adotamos o termo “assédio” para designar os comportamentos impositivos do macho em relação a fêmea, uma vez que em nossas observações constatamos que o macho foi motivado constantemente para copular e não aguardou ser escolhido pela fêmea. Neste experimento não identificamos comportamentos atribuíveis à corte sexual, assim como Garcia-Perez (et al, 1997) em sua publicação.

Identificamos seis comportamentos básicos de assédio do parceiro masculino, de modo a tentar realizar a posição de cópula. Não houve uma sequência a ser seguida, de modo que o inseto pôde performar um ou mais, mesclando-os em seu repertório comportamental. São eles: 1) segurar (com o primeiro par de pernas anteriores o macho segurou a fêmea dorsalmente pelo abdômen); 2) agarrar (o macho agarrou todo o corpo da fêmea dorsalmente com os três pares de pernas); 3) pular (o macho “saltou” do substrato em direção à fêmea quando estava próximo a ela); 4) montar (o macho ficou sobre a fêmea dorsalmente); 5) monitorar (o macho ficou

fisicamente distante da parceira, mas próximo para manter a vigilância) e 6) perseguir (o macho perseguiu a fêmea, em resposta à sua evasão). Em todos eles, reside intuitivamente o domínio do macho sobre a fêmea, o que possibilitaria o acesso exclusivo ao aparelho reprodutor de seu par, e conseqüentemente, a oportunidade em fecundá-la.

Em publicações pregressas (Machado, 2014; Pompílio et al, 2016; Machado et al, 2020), machos de *Rhodnius* apresentaram repertório comportamental semelhante ao observado no presente trabalho. Outras espécies de triatomíneos também foram submetidas à descrição de seu comportamento copulatório. Rojas & Cruz-Lopez (1992), ao estudarem *T. phyllosoma* e *T. pallidipenis*, mencionaram que o macho manteve posição vigilante, pulou e montou sobre a fêmea, dados que encontraram ressonância em nossos experimentos, uma vez que este repertório é o indicativo da preparação para o encaixe das genitálias masculina e feminina. Experimentos utilizando *T. infestans* apontaram que os machos também assediam suas parceiras afim de copular (Crespo & Manrique, 2007). Outra publicação que adotou o mesmo modelo animal (Manrique & Lazzari, 1994) concluiu a mesma informação. Vitta & Lorenzo (2009), ao elegerem *T. brasiliensis* em seus experimentos, descreveram que os machos da espécie mantiveram-se em posição de alerta próximos das fêmeas, e ao irem em direção a elas, pularam sobre seu dorso. Em trabalho com *T. mazzotti* (Rojas et al, 1990), os machos também monitoraram suas parceiras, pulando ou montando sobre elas em seguida. A adoção de *T. gerstaeckeri* como modelo de estudo por Garcia-Perez (et al, 1997) indicou que o macho também montou na fêmea para iniciar o cruzamento. Em nossas amostras, pudemos identificar exibições semelhantes, especialmente as de monitoramento, pulo ou salto sobre a fêmea, embora as duas últimas tenham sido as menos registradas. Estas observações indicam que há um repertório comportamental de cópula relativamente homogêneo dentro da subfamília Triatominae.

Grupos externos à subfamília Triatominae encontram similaridades em relação ao engajamento do macho em ser o primeiro a tentar copular. Estudos envolvendo dípteros, por exemplo, descreveram resultados semelhantes. Em sua revisão acerca do comportamento sexual de culicídeos do gênero *Aedes*, Oliva et al (2014) mencionaram que machos deste táxon costumam interceptar as fêmeas durante o voo, sozinhos ou em agregados (“leks”). Outros machos dípteros, como por exemplo *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotomidae), cortejaram a fêmea tocando-a

fisicamente e batendo as asas (Bray & Hamilton, 1970), enquanto machos de *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Phlebotomidae) esfregaram as pernas e curvaram o abdômen para encaixar a genitália (Chelbi et al, 2012).

Em todas os dados obtidos, os casais permaneceram estáticos, embora seja interessante mencionar dois comportamentos que não foram compartilhados por todos os pares. Foi observado que algumas fêmeas se locomoveram pela arena copulatória enquanto o macho continuava com a genitália encaixada em sua parceira, de modo que este evento não o perturbou, pelo menos não aparentemente. Por sua vez, também foi identificado que alguns machos realizaram movimentos abdominais durante o cruzamento com seu par. Do ponto de vista descritivo, o macho pareceu exercer algum tipo de força ou pressão sobre a genitália feminina. Ambos os comportamentos, no entanto, embora observados em alguns espécimes, não foram homogêneos entre todos os casais pareados. Concluímos, portanto, que estes comportamentos parecem ser mais uma exceção do que uma regra.

Em nossas observações, fêmeas de *R. prolixus* que não demonstraram receptividade para copular apresentaram comportamentos afim de sinalizar a seu parceiro a rejeição a ele. Identificamos quatro tipos: 1) estridulação (observado quando a fêmea friccionou a probóscide no sulco estridulatório, na região ventral); 2) compressão abdominal (observado quando a fêmea comprimiu o abdômen no substrato da placa de Petri); 3) movimento abdominal (observado quando a fêmea esticou as pernas de modo a ficar mais alta em relação ao macho); 4) evasão (observado quando a fêmea fugiu do contato do parceiro). Este repertório identificado em nosso trabalho foi a reação ao assédio realizado pelo macho, uma vez que este não esperou ser escolhido pela parceira, tentando copular com ela independente de sua receptividade ou não.

O artigo de Manrique & Lazzari (1994) foi o primeiro a identificar que a fêmea de *T. infestans* estridulava como resposta de rejeição à tentativa do macho em cruzar. Posteriormente, Vitta & Lorenzo (2009) não identificaram estridulação no repertório de comportamento sexual de fêmeas de *T. brasiliensis*, embora tenham observado performances semelhantes a *T. infestans*. Outros comportamentos heterogêneos aos descritos anteriormente foram identificados: fêmeas de *T. mazzottii* rejeitaram seus parceiros empurrando-os com o auxílio das pernas posteriores e com pequenos pulos que ocasionavam a desistência do macho (Rojas et al, 1990). Fêmeas de *T. gerstaeckeri* não-receptivas realizaram movimentos abdominais quando os machos

subiam sobre elas (Garcia-Perez et al, 1997). Dados similares foram encontrados por Pires et al (2004) em trabalho com *P. megistus* Fêmeas do gênero *Rhodnius* que não demonstraram disponibilidade para copular apresentaram conjunto comportamental semelhante aos descritos anteriormente, como *R. robustus*, eleito como modelo de experimentação por Machado et al (2020), assim como em trabalho com *R. prolixus* (Manrique & Schilman, 2000).

A análise estatística nos permitiu concluir que as fêmeas exerceram papel fundamental para a ocorrência da cópula. Em nosso trabalho, foi esperado que o macho tentasse copular e mantivesse um padrão comportamental afim de conseguir acesso à genitália feminina, tendo em vista a literatura anteriormente mencionada. No entanto, foi o poder de escolha da fêmea que ativou o eixo aceitação/rejeição, o que influenciou de sobremaneira a ocorrência ou não da cópula.

As informações extraídas do presente trabalho em comparação à literatura pesquisada nos permitem concluir que existe equivalência de comportamentos de rejeição das fêmeas não-receptivas entre diversas espécies da subfamília Triatominae.

Fêmeas de *Ae. albopictus* (Diptera, Culicidae) receptivas permitiram contato genital. Aquelas que foram refratárias às tentativas do macho demonstraram sua rejeição por meio de chutes no macho com o segundo e terceiro pares de pernas, ou voando fora do campo de alcance do parceiro (Benelli, 2015).

A cópula do gênero *Rhodnius* é a mais longa dentre as espécies já estudadas da subfamília Triatominae, o que nos permite induzir duas hipóteses. A primeira está relacionada a aspectos fisio-anatômicos do órgão reprodutor masculino. Em seu trabalho, Davey (1958) observou que o macho transferiu o espermátóforo a partir de 12 minutos após iniciada a cópula, e o tempo prolongado do cruzamento seria atribuído ao retraimento do saco espermátóforo, estrutura do aparelho reprodutor masculino que ao produzir o espermátóforo incha. Nossos dados podem indicar análise similar, uma vez que em nosso trabalho o tempo mínimo para transferência do espermátóforo foi de 13 minutos. Uma outra amostragem coletada poderia indicar a possibilidade desta hipótese: um casal que copulou por 10min35s não obteve sucesso copulatório, uma vez que a fêmea não descartou o espermátóforo, indicando assim que o macho se mostrou ineficiente em transferir seu ejaculado neste período de tempo. Em trabalho publicado por Machado et al (2020), *R. robustus* necessitou de tempo mínimo de 14 minutos para transferir o ejaculado. Seria interessante que dados

amostrais mais consistentes fossem coletados afim de investigar e confirmar esta hipótese, que não pôde ser sustentada pelo presente trabalho realizado.

A segunda hipótese está relacionada a aspectos comportamentais. Baseados no trabalho de Dickinson (1986), sugerimos a aplicação da Hipótese da Cópula Longa, termo cunhado pela autora mencionada. Em seu estudo, a autora propôs que machos com cópulas com duração de tempo mais elevada poderiam superar o ejaculado dos rivais, o que garantiria, assim, a paternidade exclusiva ou parcial da prole da fêmea.

Considerando as observações descritas anteriormente dos comportamentos de assédio e recusa, podemos concluir que existe a promoção de conflito de interesses entre macho e fêmea. Do ponto de vista do parceiro masculino, é interessante que este amplie as probabilidades em fertilizar suas parceiras afim de assumir a paternidade da geração seguinte, e conseqüentemente, reduzir as chances de rivais. Por outro lado, a fêmea deseja maximizar a diversidade e qualidade genética de seus descendentes, o que a torna, portanto, seletiva e criteriosa entre os machos.

Alguns trabalhos relataram o hábito poliândrico (*poli* = muitos; *-andro* = macho) de algumas fêmeas de espécies de triatomíneo (Trejos et al, 1966; Baldwin, 1971; Garcia-Perez et al, 1997; Daflon-Teixeira et al, 2009; Vitta & Lorenzo, 2009; Pontes, 2010), em contraponto ao comportamento monogâmico de fêmeas de *Panstrongylus megistus* (Pires et al, 2004). As qualidades genéticas dos machos expressas em caracteres fenotípicos são acessadas de alguma forma pelas fêmeas, que tendem a ser exigentes em conceder acesso à genitália, e posteriormente à fertilização dos ovos, o que justificaria os comportamentos de assédio dos machos observados no presente experimento. Os machos tentaram superar as rejeições de suas parceiras assediando-as como forma de reduzir o custo energético e o tempo em cortejá-las, e não serem selecionados por aquelas para copular. Ao assediarem suas parceiras de forma impositiva, os machos maximizaram a probabilidade de fecundá-las e reduziram as oportunidades de possíveis rivais em ter acesso a elas. Embora em nosso trabalho tenhamos observado comportamentos de casais artificialmente monogâmicos, ou seja, que copularam apenas uma única vez, alguns trabalhos forneceram evidências empíricas da existência desse sistema de discordância entre os sexos. Machos de *T. garstaeckri* tentaram deslocar o macho que copulava com a fêmea, segundo a observação de Garcia-Perez et al (1997).

Em contraponto ao repertório comportamental das espécies de triatomíneos já estudadas, os machos da mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster* (Diptera,

Drosophilidae) seguem rituais coreografados de cortejo sexual à parceira feminina, culminando no sucesso copulatório (Rezaei, 2015; Koemans, 2017; Dauwalder, 2020). Em contraste, fêmeas desta espécie rejeitam seus parceiros chutando-os com as pernas e fugindo do campo de ação do parceiro masculino, conforme pontuado por Dauwalder (2020). Os trabalhos que selecionaram *D. melanogaster* como modelo de estudo indicam que o papel de decidir se a cópula irá ocorrer ou não pertence à fêmea (Dauwalder, 2020), dado que se reflete nos resultados dos autores que observaram o comportamento sexual de triatomíneos.

A fêmea, ao ser assediada pelo macho, encara uma decisão crítica em copular ou não. Portanto, seria interessante não menosprezar seu papel, uma vez que a sobrevivência e perpetuação de seus genes depende do acesso qualitativo às características genéticas do macho. Este acesso qualitativo, no entanto, precisa ser otimizado. Uma vez que a fêmea rejeite constantemente vários parceiros afim de aguardar o melhor que carregue os melhores genes, ela corre o risco de não o encontrar, e perder a oportunidade de copular com parceiros anteriores que tinham bons genes (Pompílio et al, 2016). Além disso, a senescência reduziria a sua capacidade de ser atrativa aos machos, que já demonstraram ter preferências por fêmeas virgens e mais novas (Vitta & Lorenzo, 2009). Do ponto de vista da fêmea, a escolha entre esperar o macho com a melhor qualidade genética deve ser balanceada com a sua capacidade em se manter atrativa a ele.

A discordância entre os sexos repousa, portanto, nas diferenças nos gastos de gametas de machos e fêmeas (Shamloul et al, 2010). Em geral, machos investem menos no evento reprodutivo, o que o levaria a explorar mais o sucesso copulatório do que a qualidade deste. Afim de atingir esse objetivo, o macho se torna dependente de sua habilidade em tentar acessar o maior número possível de fêmeas (Kvanerno & Simmons, 2013). Para estas, o sucesso reprodutivo seria a meta a ser atingida, tendo em vista o alto gasto energético despendido na produção e disponibilização de óvulos férteis. Como o óvulo é uma célula que requer mais gasto energético, a fêmea se torna inclinada a ser criteriosa, e copular com os machos que forneçam as maiores chances de produzir uma prole de qualidade gênica (Simmons, 2001).

Admite-se que a poliandria possa reduzir a capacidade de determinado macho em monopolizar uma fêmea ou mais, o que o enfraqueceria do ponto de vista da seleção sexual (Jennions & Petrons, 2000; Simmons, 2001, Kvanerno & Simmons, 2013). Além disso, seria importante considerar que a poliandria também exerce uma

forte pressão seletiva nos machos, e um dos motivos pelos quais competem entre si advém da competição espermática, evento que ocorre quando o espermatozóide de dois ou mais machos disputam a fertilização do óvulo (Parker, 1970, Shamloul et al, 2010). As fêmeas poderiam se beneficiar disso tomando como suposição de que os machos ejaculariam mais, fornecendo maior quantidade de esperma, porém elevando o custo energético para copular com a próxima fêmea (Dickinson, 1986; Kvarnemo & Simmons, 2013). No entanto, a poliandria cria um complexo sistema no qual o casal se torna vulnerável, uma vez que estão sob risco de predação, gasto de tempo e energia para localização de parceiros e abrigos, bem como o risco de infecções sexualmente transmissíveis (redução da função imunológica), além da fêmea também estar sujeita a produtos químicos advindos do macho que podem reduzir sua capacidade reprodutiva. Estes riscos podem ter sido contornados e parcialmente superados pelas espécies de triatomíneos adaptados a domiciliação, como é o caso de *R. prolixus* na Venezuela, ou então *R. robustus*, que copula em palmeiras.

Neste trabalho, observou-se que a maioria dos casais pareados recusou-se a copular, ou pelo menos não demonstrou receptividade, especialmente a fêmea. O número de cópulas versus o número de pareamentos parece entrar em conflito, mas este contraste, uma vez observado, correspondeu ao que já era esperado, tendo em vista o conhecimento empírico sobre comportamento de cópula em insetos. É interessante mencionar que a não receptividade, e portanto, a não ocorrência de cópula, foi mais esperada que o próprio cruzamento, considerando toda a discussão acerca da escolha da fêmea. Dauwald (2020) comentou que em *Drosophila melanogaster*, fêmeas maduras virgens necessitaram de tempo para acessar o cortejo do macho, expresso através de rejeição inicial ao se afastar do parceiro. Se escolhido, o macho foi sinalizado pela fêmea. Ishimoto and Kamikouchi (2020) elegeram esta mesma espécie como modelo de estudo, e observaram que a transição de rejeição para aceitação do cortejo do macho passou por um sofisticado sistema neural, que processou a identificação de feromônios e som de cortejo. Ainda segundo os dados obtidos pelos autores, a manipulação de determinados neurônios envolvidos no processo rejeição/aceitação reduziu a recusa da fêmea.

Neste trabalho, a cópula foi considerada encerrada quando o macho retirou seu órgão genital e o retraiu, iniciando o período pós-copulatório, ou de guarda. Nestes casais que realizaram o cruzamento, pudemos observar que em alguns casos os

parceiros masculinos permaneciam sobre a fêmea, mantendo a posição de cópula, ainda que as genitálias de ambos não estivessem em contato.

Este fato também pôde ser observado por Rojas et al (1990), ao estudar *T. mazzottii*; e *T. gerstaeckeri*, que foi estudado por Garcia-Perez et al (1997), que não se separaram imediatamente da fêmea. Em contraste às descrições anteriores, Rojas e Cruz-Lopez (1992) não identificaram este comportamento em *T. phyllosoma* e *T. pallidipenis*, que ao encerrarem o cruzamento se desacoplam da parceira feminina, bem como Manrique e Lazzari (1994) ao observarem *T. infestans*. Comportamentos de guarda semelhantes ao encontrados no presente experimento foram descritos em *R. prolixus* (Machado et al, 2019). Em um grupo externo aos triatomíneos, machos de *Ae. albopictus*, após finalizarem o cruzamento, permanecem próximos à fêmea, porém em repouso, e alguns segundos depois se afastam desta (Benelli, 2015).

Nossos experimentos puderam demonstrar que existem comportamentos relativos ao macho afim de monopolizar o acesso à genitália da fêmea. Conforme já discutido anteriormente, é importante do ponto de vista masculino que ele consiga administrar o contato com sua parceira desde o momento de sua identificação até a finalização da cópula. Outro comportamento de guarda descrito em nosso trabalho foi o de vigilância e monitoramento da fêmea. Ao se manter próximo de sua parceira, o macho garante parcialmente que ela não irá copular com um rival. Em algumas amostras, pudemos observar fêmeas que se deslocavam pela arena copulatória quando finalizado o cruzamento, e seus parceiros as perseguiram. Os machos guardaram suas fêmeas segurando-as, mantendo a posição de cópula, ou soltandoas, mas permanecendo vigilantes.

Admite-se que haja um gasto energético da parte do macho em conceder tempo em assediar, copular e guardar sua parceira, o que poderia resultar em fracasso do seu ponto de vista, uma vez considerando o comportamento poliândrico de algumas espécies de fêmeas. Ao proteger a fêmea após o cruzamento, o macho intuitivamente estaria protegendo seu ejaculado, e portanto, o material transferido e ela. O custo de despender tempo protegendo e guardando a fêmea de possíveis rivais seria superado pelo benefício em ter os óvulos dela fertilizados por seus espermatozóides.

O tempo cronometrado do período pós-copulatório foi encerrado quando macho e fêmea se afastavam, não permanecendo próximos.

Em sua revisão, Alcock (1994) discutiu sobre os principais comportamentos que os machos exibiam quando finalizavam a transferência de seus espermatozóides,

permanecendo próximos à parceira, o que o levou a propor a Hipótese da Guarda de Parceiro. Segundo esse autor, associações pós-copulatórias em alguns grupos de insetos puderam ser analisadas em seu trabalho, considerando alguns tipos de associações ou comportamentos quando macho e fêmea encerravam o cruzamento.

Em nosso trabalho, comparamos as descrições deste autor com os resultados obtidos pela observação do comportamento de guarda, o que nos levou a considerar que machos de *R. prolixus* exercem o que Alcock chamou de 'agarramento', quando permanecem fisicamente presos à fêmea, e 'monitoramento', quando circulam próximos da parceira. Ainda segundo Alcock, machos de alguns grupos de insetos poderiam se valer da extensão do tempo de cópula para proteger seu ejaculado, o que foi anteriormente discutido e pontuado por Dickinson (1986). Conforme mencionado, existe a possibilidade de que machos do gênero *Rhodnius* mantenham-se mais tempo que o necessário para transferir o espermátóforo, afim de proteger então seu ejaculado de possíveis rivais. No entanto, nosso trabalho se mostra impossibilitado em analisar globalmente as dinâmicas operantes. Seria interessante entender a linha tênue que separa o tempo necessário de transferência do espermátóforo e a extensão da cópula além para proteção do material genético masculino.

Essa nebulosa questão poderia ser parcialmente respondida pelo trabalho de Vitta & Lorenzo (2009). Ao elegerem *T. infestans* como modelo animal, os autores observaram que no sistema 3M:1F (3 machos para 1 fêmea) alguns machos estiveram associados com suas parceiras mais tempo que o necessário após a cópula, embora não tenha sido estatisticamente diferente dos resultados no sistema 1M:1F (1 macho para 1 fêmea). O fato da maioria das fêmeas terem aceitado ser guardadas por seus parceiros pode sugerir que elas não estavam interessadas em copular com outro macho por um período do tempo, o que mobilizaria seu parceiro a defendê-la de novos possíveis machos. Acreditamos, portanto, que os comportamentos sexuais da subfamília Triatominae apresentam repertório homogêneo, guardadas as devidas proporções dentro de cada gênero.

6. CONCLUSÃO

- A descrição do comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* é similar a de outras espécies da subfamília Triatominae, especialmente as do gênero *Rhodnius*;
- O período pré-copulatório, ou a velocidade da tentativa de cópula de *Rhodnius prolixus* durou em média 3min16s;
- Os machos tentaram copular com a mesma parceira duas vezes em média.
- Foram identificados seis comportamentos de assédio do macho:
- As fêmeas apresentaram quatro comportamentos de rejeição aos machos:
- O período copulatório, ou tempo de cópula de *Rhodnius prolixus* durou em média 40min9s;
- O período pós-copulatório, ou tempo de guarda de *Rhodnius prolixus* durou em média 4min4s;
- A maioria das fêmeas aceitou ser guardada pelo parceiro masculino após a finalização da cópula.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(1):57-69.

Alevi, K.C.C.; de Oliveira, J.; da Silva Rocha, D.; Galvão, C. 2021. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. *Pathogens*, 10, 1627.

Almeida CE, Lima MM, Costa J. Ecologia dos vetores. In: Galvão C, et al (Org.) *Série Zoologia: Guia e Manuais de Identificação*. Curitiba: UFP; 2015. p. 33-39.

Barrett TV. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas' disease. In: Harris KF (ed) *Advances in Disease Vector Research*. 223p. Estados Unidos: Ed. Springer; 1991. p. 143-175. Barrett TV. Current research on Amazonian triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83(Suppl 1):441-7.

Barnabé C, Brenière SF, Guégan JF, Blanchet D, Aznar C. Molecular characterization of *Rhodnius robustus* specimens, potential vectors for Chagas disease in French Guiana, South America. *Infect Genet Evol* 2018; 59:28-31.

Benelli G. The best time to have sex: mating behaviour and effect of daylight time on male sexual competitiveness in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2015; 114:887-894

Bray DP, Hamilton JGC. Courtship behaviour in the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, the New World vector of visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 2007; 21:332-338.

Brito RN, Souza RCM, Abad-Franch F. Dehydration-Stress Resistance in Two Sister, Cryptic *Rhodnius* Species-*Rhodnius prolixus* and *Rhodnius robustus* Genotype I (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 2019; 56(4): 1019-1026.

Chelbi I, Bray DP, Hamilton JGC. Courtship behaviour of *Phlebotomus papatasi* the sand fly vector of cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2012; 5:19.

Dauwalder B. Mate Choice: Should I Mate or Should I Go?. *Current Biology* 2020; 30 (3):118-120.

Davey KG. The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus* Stal. *J Exp Biol* 1958; 35:694-701.

Dickinson JL. Prolonged mating in the milkweed leaf beetle *Labidomera clivicollis clivicollis* (Coleoptera: Chrysomelidae): a test of the “sperm-loading” hypothesis. *Behav Ecol Sociobiol* 1986; 18 (5):331-338.

Shamloul R, El-Sakka A, Bella AJ. Sexual selection and genital evolution: an overview. *J Sex Med* 2010; 7:1734–1740.

Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, Muñoz M. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? *Trop Med Int Health* 2002; 7(3): 280-7.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saude Publ* 1980; 14:265-299.

Parker GA. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev* 1970; 45:525-567.

Pavan MG; Monteiro FA. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Inter Health* 2007; 12:751-758.

Pavan MG, Mesquita RD, Lawrence GG, Lazoski C, Dotson EM, Abubucker S, Mitreva M, Randall-Maher J, Monteiro FA. A nuclear single-nucleotide polymorphism (SNP) potentially useful for the separation of *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol.* 2013; 14:426-33.

Pavan MG, Corrêa-Antônio J, Peixoto AA, Monteiro FA, Rivas GB. *Rhodnius prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae) nymphs show different locomotor patterns on an automated recording system. *Parasit Vectors* 2016; 9:239.

Pereira-Lourenço AS, Santos-Mallet JR, Freitas SPC. Anatomy of the spermatophore in triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its applications to the study of Chagas’ disease vector biology. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89(4):775-780.

Pires HHR, et al. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(3):295-30

Pompilio L, Franco MG, Chisari LB, Manrique G. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour* 2016; 1-16.

Vitta ACR; Lorenzo MG. Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 2009; 46(4):789-795.

Rodrigues AL, Jansen AM. Ecologia dos vetores. In: Galvão C, et al (Org.) Série Zoologia: Guia e Manuais de Identificação. Curitiba: UFP; 2015. p. 75-87.

Galvão C, Jurberg J. Morfologia externa dos adultos. In: Galvão C, et al (Org.) Série Zoologia: Guia e Manuais de Identificação. 289p. Curitiba: UFP; 2015. p. 33-39.

Galvão C. (2021) Taxonomy. In: Guarneri A., Lorenzo M. (eds) Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors. Entomology in Focus, vol 5. Springer, Cham.

Gullan PJ, Krinston PS. 2000. Reproduction. In: The Insect: An Outline of Entomology. 2ª ed. Austrália: Ed Blackwell Science. pp. 111-137.

Triplehorn CA, Johnson NF. Estudo dos Insetos. 7ed. Cengage Learning, São Paulo, 2015. p. 269-295

Garcia AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard JR, Frame IA, Valente SAS, Miles MA. Random Amplification of Polymorphic DNA as a Tool for Taxonomic Studies of Triatomine Bugs (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 1998; 35(1):38-45.

Grimaldi D, Engel MS. 2005. Evolution of the Insects. 755 pp. Cambridge University Press.

Ishimoto H, Kamikouchi A. A feedforward circuit regulates action selection of pre-mating courtship behavior in female *Drosophila*. Curr Biol 2020; 30:396-407.

Jennions MD, Petrie M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. Biol Rev 2000; 75:21-64.

Krinsky WL. True Bugs (Hemiptera), Editor(s): Gary R. Mullen, Lance A. Durden, Medical and Veterinary Entomology (Third Edition), Academic Press, 2019, 107-127

Gaunt M, Miles M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(4):557-565.

Miles MA, Arias JR, De Souza AA. Chagas' Disease in the Amazon Basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* – triatomine vectors of Chagas' Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1983; 78(4): 391-398.

Myers JG. Facultative blood-sucking in phytophagous Hemiptera. Parasitology 1929; 21:472-480.

Rezaei A, Krishna MS, Santhosh HT. Male age affects female mate preference, quantity of accessory gland proteins, and sperm traits and female fitness in *D. melanogaster*. *Zoological Science*, 2015; 32 (1):16-24

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Presgrave OAF, Cunha V, Galvão C. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. *Rev Saúde Pub* 2001; 35(4):400-406.

Regis L, Gomes YM, Furtado AF. Factors influencing male accessory gland activity and first mating in *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Sci Applic* 1985; 6(5):579-583.

Schaefer CW. Heteropteran adventitious biters (Hemiptera): Primitively predaceous? *Entomological News* 2003; 114:211-216.

Schofield CJ, Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual Biol* 1999; 21(71):183-197.

Soares RP, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Trop*. 1998; 71(3):285-91.

Tonn RJ.; Carcavallo RU.; Ortega R. Notas sobre la biología, ecología y distribución geográfica de *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae). *Bol Dir Malariol San Amb* 1976; 16:158-162

Kvarnemo C, Simmons LW. 2013 Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Phil Trans R Soc B* 368:20120042.

Koemans TS, Oppitz C, Donders RAT, Van Bokhoven H, Schenck A, Keleman K, Kramer JM. *Drosophila* courtship conditioning as a measure of learning and memory. *J Vis Exp* 2017; (124) e55808, doi:10.3791/55808.

Khalifa B. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stål. (Hemiptera; Reduviidae). *Parasitol* 1950; 40:283-289.

Lazzari, CR. Ecologia dos vetores. In: Galvão C, et al (Org.) *Série Zoologia: Guia e Manuais de Identificação*. Curitiba: UFP; 2015. p. 64-74.

Lent H, Jurberg J. Estudo morfológico comparativo de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Brasil Biol* 1968; 28:499-520.

Lima MM, Jurberg J, Almeida JR. Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) in the laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81(1):1-5.

Lima MM, Jurberg J, Almeida JR. Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. II. Influence of feeding, lighting and time of day on the number of matings, mating speed and duration of copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81(4):381-385.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 1999; 60(3):377-38.

Manrique G, Lazzari CR. Sexual behavior and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(4):629-633

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Am J Trop Med Hyg 2000; 62(4):460–465

Monteiro FA, Escalante AA, Beard CB. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. Trends Parasitol 2001; 17(7):344-347.

Monteiro FA, Lazoski C, Noireau F, Solé-Cava AM. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. Med Vet Entomol 2001; 16:83-90.

Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. Mol Ecol 2003; 12(4):997-1006.

Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. BMJ 2003; 326(7404):1444-8.

Oliva CF, Damiens D, Benedict BQ. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. Acta Tropica 2014; 132:12-19.

Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). Infect Genet Evol 2002; (2):121-8.

Weirauch C, Shuch RT. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Annu Rev Entomol* 2011; 56:487-510.