

Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ
Mestrado em Ciências da Saúde
Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Sinais de agregação em *Panstrongylus megistus*
e a interação desta espécie com *Triatoma infestans*
no interior de abrigos.**

Theo Rolla de Paula Mota



Belo Horizonte

Março 2006

Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ
Mestrado em Ciências da Saúde
Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Sinais de agregação em *Panstrongylus megistus*
e a interação desta espécie com *Triatoma infestans*
no interior de abrigos.**

Theo Rolla de Paula Mota

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

Orientador: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

Trabalho realizado no Laboratório de Triaromíneos
e Epidemiologia da Doença de Chagas,
Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ.

Belo Horizonte

Março, 2006

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

M917s Mota, Theo Rolla de Paula
2006

Sinais de agregação em *Panstrongylus megistus* e a interação desta espécie com *Triatoma infestans* no interior dos abrigos / Theo Rolla de Paula Mota. – Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisa René Rachou, 2006.

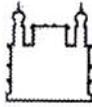
xviii, 104 f.: il; 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 88-102

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

1. Ecologia Química 2. Comportamento 3. *Pastrongylus megistus*
I. Título. II. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Orientador).

CDD – 22. ed. – 616.936 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

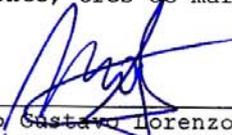
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

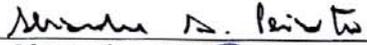
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da décima nona defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Theo Rolla de Paula Mota, sob a orientação do Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo.

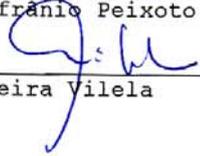
Aos três dias do mês de março do ano de dois mil e seis, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da décima nona dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A dissertação do aluno Theo Rolla de Paula Mota intitula-se "Sinais de agregação em *Panstrongylus megistus* e a interação desta espécie com *Triatoma infestans* no interior de abrigos". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dr. Alexandre Afrânio Peixoto - IOC/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Evaldo Ferreira Vilela - UFV (membro titular) e Dra. Liléia Diotaiuti - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após argüir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado Aprovado. Uma vez encerrado o exame, eu, Marcelo Gustavo Lorenzo, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, três de março de dois mil e seis.



Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo



Dr. Alexandre Afrânio Peixoto



Dr. Evaldo Ferreira Vilela

Terrível é o pensar.
Eu penso tanto
E me canso tanto com meu pensamento
Que às vezes penso em não pensar jamais.
Mas isto requer ser bem pensado
Pois se penso demais
Acabo dispensando tudo que pensava antes
E se não penso
Fico pensando nisso o tempo todo.

Reflexão Sobre a Reflexão - Millôr Fernandes

Dedico este trabalho

À minha querida mãe Simone Ribeiro Rolla, pelo exemplo de força,
pela educação, pelo incondicional apoio e
pelo amor que derrama sobre meu lar.

Ao meu pai Antônio Humberto Soares de Paula Mota pelos ensinamentos, pelas
experiências e pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcelo Lorenzo pela grande orientação. Pelo entusiasmo científico e pelas discussões tão construtivas. Por todo o conhecimento adquirido, pelas oportunidades oferecidas e a cima de tudo, pela amizade.

À Dr^a Liléia Diotaiuti, grande mãe de nosso laboratório, por unir nesse ambiente todas essas pessoas maravilhosas. Pelos inúmeros exemplos de humanismo, competência e por sua luz. Obrigado por todas as conversas, sempre agradáveis.

Ao Dr. João Carlos Pinto Dias, pela atenção e disponibilidade.

Ao Dr. Cláudio Lazzari por todos os comentários e demonstrações de sabedoria.

Ao Dr. Evaldo Vilela e ao Dr. Alexandre Afrânio Peixoto pela disponibilidade, paciência e comentários.

A todos meus ex-orientadores pelos ensinamentos e pelas experiências. Ao Dr. Marcos Horácio Pereira, quem me apresentou o mundo do comportamento de triatomíneos. Ao Dr. Mario de Maria, verdadeiro exemplo profissional, grande professor e orientador. À Dr^a Teofânia Vidigal pelo aprendizado e pelo exemplo de força e entusiasmo.

Aos amigos do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas pelos exemplos de vida, pela união, pela amizade, pelos momentos felizes e também pelos difíceis. Foram inúmeros cafezinhos, festas, conversas, palestras, confusões e discussões, aprendi muito com todos vocês. Meu imenso obrigado a Angélica, Carlota, Fernando, Silvinhas, Thessa, Diogo, Violeta, Inês, Ivan, Marcos, João Paulo, Alexandre, Valdivino, Marco Antônio, Denise, Tim, Alessandra, Flávio, Aninha, Raquelita, Gina, Grasi, Maria, enfim, essa grande família de 'barberólogos'.

À Ana Cristina Renna de Vitta, quem praticamente me orientou quando cheguei ao LATEC, ainda na iniciação científica. Pelas imensas ajudas, pelas colaborações, pelas experiências, conversas e amizade.

À Raquel Aparecida Ferreira por trazer a nós tanta alegria. Pela grande amizade, inúmeras risadas e constante apoio.

À Gina Barcelos Pontes, grande amiga. Pelas várias ajudas, constantes conversas e trabalhos de campo.

À Maria Inês de Oliveira Mascarenhas pela disponibilidade, ajuda na burocracia nossa de cada dia e inexpressável ajuda na formatação desta tese.

À Anna Carolina Lustosa Lima pela enorme ajuda na estatística e pelas conversas.

Aos triatomíneos por crescerem e se multiplicarem, permitindo o desenvolvimento deste projeto.

Às galinhas, por doarem seu sangue a este trabalho.

Aos colegas da Biologia, turma da UFMG, pelos inúmeros momentos que vivemos, pela amizade, pelas festas, pelo conhecimento trocado e convivência diário no DA-BIO. Valeu Raoni, Fred, Glênio, Leandro, Bê, Bruninho, Sus, Lombris, Nando, Jonny, Rúbio, Flávio, Pedrinho, Felipe, Alexandre, Rocha, Pablo, Rafa, Carol, Jarina, Lia, Bia, Jú, Nara, Aninha, Marina, Fernanda e desculpe se esqueci de alguém.

Aos sempre amigos Marcos, Rafa, Bola, Marquinhos, Renato, Fredão, Tiago, Vevs, Ló, Ya, Lorena e Joana por cultivarem amizade seja onde, como e porque for.

A toda minha grande família, onde aprendi a força do amor. Obrigado por tudo Vó Didila, Vó Ana, Vô Guido, Tia Déia, Tio Rafa, Tio Rodrigo, Tia Renata, Tia Carol, Tio Marco, Tia Cláudia, Tia Ré, Tio Paulinho, Titita, Marcos, Alfredo, Evandro, Rayana, Maíra, Raví, Ian, Igor, Tia Liliza, Tio Tônico, Camila, Pedro, Fê, Manú, Nino, desisto de dizer todos, é gente demais que eu amo.

À Vó Ana e Vô Guido, exemplos de força. Por fazer uma família tão perfeita, pelos momentos deliciosos no sítio e por todo carinho.

À Vó Tereza (*in memoriam*) e ao Vô Ciro (*in memoriam*), pelos exemplos de vida, pelos agradáveis almoços em família, por todos os momentos.

À minha querida irmã, Laís, cada dia mais linda e mais amiga.

À Renata por todos os momentos, grande apoio e companheirismo.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, os meus agradecimentos.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	VI
ÍNDICE	X
ÍNDICE GERAL	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
RESUMO	XVII
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
A DOENÇA DE CHAGAS	2
OS TRIATOMÍNEOS COMO VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS	3
A RELEVÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE <i>TRITOMA INFESTANS</i>	5
A RELEVÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE <i>PANSTRONGYLUS MEGISTUS</i>	7
A COMUNICAÇÃO QUÍMICA EM TRIATOMÍNEOS	11
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO 1: ATRAÇÃO ÀS FEZES EM <i>PANSTRONGYLUS MEGISTUS</i>.....	17
INTRODUÇÃO	18
O COMPORTAMENTO DE AGREGAÇÃO EM TRIATOMÍNEOS	19
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
1. ORGANIZAÇÃO E MANUTENÇÃO DE COLÔNIAS	27
2. TESTES PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA COMPORTAMENTAL.....	27
2.1. <i>Insetos</i>	27
2.2. <i>Desenho experimental</i>	27
2.3. <i>Controle</i>	28
2.4. <i>Análise Estatística</i>	30
3. DESENVOLVIMENTO E TESTE DE UMA MISTURA DAS SUBSTÂNCIAS	30
3.1. <i>Desenho experimental</i>	30
3.2. <i>Análise estatística</i>	31
4. TESTE DO POTENCIAL DE ATRAÇÃO DE ABRIGOS IMPREGNADOS COM A MISTURA DE ODORES	31
4.1. <i>Insetos</i>	31
4.2. <i>Desenho experimental</i>	31
4.3. <i>Análise estatística</i>	32

RESULTADOS	33
1. TESTES PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA COMPORTAMENTAL	34
2. TESTE DA MISTURA DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS	34
3. TESTE DO POTENCIAL DE ATRAÇÃO DE ABRIGOS IMPREGNADOS COM A MISTURA	34
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	38
CAPÍTULO 2: EXISTEM INTERAÇÕES DE AGREGAÇÃO OU REPELÊNCIA ENTRE PANSTRONGYLUS MEGISTUS E TRIATOMA INFESTANS NO INTERIOR DE ABRIGOS?.....	47
INTRODUÇÃO	48
O USO DE ABRIGOS PELOS TRIATOMÍNEOS.....	49
AGREGAÇÃO OU REPELÊNCIA NO INTERIOR DE ABRIGOS ENTRE <i>P.MEGISTUS</i> E <i>T.INFESTANS</i> ?.....	51
OBJETIVOS	54
OBJETIVO GERAL.....	55
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
MATERIAIS E MÉTODOS	56
1. ORGANIZAÇÃO E MANUTENÇÃO DE COLÔNIAS	57
2. INSETOS	57
3. EFEITO DA DENSIDADE DE INSETOS E DA ILUMINAÇÃO DO AMBIENTE SOBRE O USO DE ABRIGOS	57
3.1. <i>O efeito da densidade de insetos.....</i>	57
3.1.1. <i>Desenho experimental</i>	57
3.1.2. <i>Análise Estatística</i>	58
3.2. <i>O efeito da iluminação.....</i>	58
3.2.1. <i>Desenho experimental</i>	58
3.2.2. <i>Análise Estatística</i>	59
4. ESTUDO DA INTERAÇÃO EM ABRIGOS ENTRE <i>T.INFESTANS</i> E <i>P.MEGISTUS</i>	59
4.1. <i>Agregação ou repelência interespecífica no abrigo entre <i>T.infestans</i> e <i>P.megistus</i>?</i>	59
4.1.1 <i>Desenho experimental</i>	59
4.1.2 <i>Controles</i>	60
4.2. <i>A presença de uma espécie no abrigo afeta a entrada da outra espécie?</i>	60
4.3. <i>Análise do padrão de distribuição de cada espécie nas diferentes séries experimentais.</i>	61
4.3.1. <i>Avaliação da distribuição em abrigos nas diferentes séries experimentais.</i>	61
4.4.2 <i>Avaliação do número de insetos fora dos abrigos nas diferentes séries experimentais.</i>	61
4.4.3. <i>Avaliação da distribuição de cada espécie nos abrigos quando co-habitam na arena.</i>	62
RESULTADOS	63
1. EFEITO DA DENSIDADE DE INSETOS E DA ILUMINAÇÃO DO AMBIENTE SOBRE O USO DE ABRIGOS	64
1.1. <i>O efeito da densidade de insetos.....</i>	64
1.2. <i>O efeito da iluminação.....</i>	64
2. ESTUDO DA INTERAÇÃO EM ABRIGOS ENTRE <i>T.INFESTANS</i> E <i>P.MEGISTUS</i>	65
2.1. <i>Agregação ou repelência interespecífica no abrigo entre <i>T.infestans</i> e <i>P.megistus</i>?.....</i>	65
2.2. <i>A presença de uma espécie no abrigo afeta a entrada da outra espécie?</i>	66
2.3. <i>Análise do padrão de distribuição de cada espécie nas diferentes séries experimentais.</i>	66
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	70
DISCUSSÃO GERAL	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Índice de Figuras

Figura 1.	<i>Triatoma infestans</i> Klüg 1834. Fonte: icb.usp.br/~marcelcp.	6
Figura 2.	Área geográfica onde <i>T. infestans</i> já foi detectado. Fonte: Schofield 1994.	6
Figura 3.	<i>Panstrongylus megistus</i> (Burmeister, 1835). Fonte: icb.usp.br/~marcelcp.	8
Figura 4.	Área geográfica onde <i>P. megistus</i> já foi detectado. Fonte: Schofield 1994.	8
Figura 5.	Comportamento de defecação de <i>T. infestans</i> em relação ao abrigo. O inseto sai do abrigo (1), vira 180° (2) e caminha para trás vários centímetros (3), para e defeca (4), depois retorna ao abrigo. Todo esse procedimento dura cerca de 20 segundos. Fonte: Lorenzo & Lazzari 1996.	20
Figura 6.	Desenho experimental para testar a atração dos insetos às substância sintéticas ou à mistura das mesmas. (a) detalhe da arena experimental. (b) desenho completo, que permite a realização de quatro ensaios simultâneos.	29
Figura 7.	Desenho experimental para o estudo da agregação de grupos de triatomíneos em abrigos artificiais. À direita um detalhe do abrigo artificial feito de papelão corrugado.	29
Figura 8.	Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de ácido acético foram testadas no comportamento de <i>P. megistus</i> .	35
Figura 9.	Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de ácido isovalérico foram testadas no comportamento de <i>P. megistus</i> .	35
Figura 10.	Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de ácido hexanóico foram testadas no comportamento de <i>P. megistus</i> .	36
Figura 11.	Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de acetamida foram testadas no comportamento de <i>P. megistus</i> .	36
Figura 12.	Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de 2,3-butanodiol foram testadas no comportamento de <i>P. megistus</i> .	37
Figura 13.	Proporção média de insetos fora dos abrigos quando diferentes densidades de insetos foram liberadas na arena. Os dados referentes a <i>P. megistus</i> estão representados em vermelho, enquanto os referentes a <i>T. infestans</i> estão em azul.	68
Figura 14.	Média de <i>T. infestans</i> e <i>P. megistus</i> fora do abrigo sob ciclo de luz 12/12 LE (vermelho) e sob escuridão permanente (azul).	68
Figura 15.	Média de <i>T. infestans</i> e <i>P. megistus</i> no abrigo 1 (vermelho), no abrigo 2 (azul) e fora dos abrigos (verde) nos quatro diferentes tratamentos: (a) isolado na arena; (b) liberado na arena simultaneamente com a outra espécie; (c) liberado na arena antes da outra espécie e (d) liberado na arena depois da outra espécie.	69
Figura 16.	Média de <i>P. megistus</i> no abrigo 1 (vermelho), no abrigo 2 (azul) e fora dos abrigos (verde) nos quatro diferentes tratamentos: (a) isolado na arena; (b) liberado na arena simultaneamente com a outra espécie; (c) liberado na arena antes da outra espécie e (d) liberado na arena depois da outra espécie.	69
Figura 17.	Biosensor utilizado nos trabalhos de campo em Piracema (MG) e Arneiroz (CE). À esquerda, parte externa apresentando fotografia à escolha do morador (1) e detalhe da abertura lateral (2). À direita, parte interna contendo sanfona de papel com orifícios (3) e dispositivo de liberação lenta e contínua dos odores (4).	82

Índice de Tabelas

Tabela 1:	Lista de compostos voláteis detectados nas fezes de <i>P.megistus</i> , <i>T.infestans</i> e <i>T.brasiliensis</i> através de SPME e GC-MS.	23
Tabela 2:	Média de insetos no abrigo experimental e no abrigo controle quando 16 ng, 160 ng e 1.6 µg de cada composto foram apresentados no abrigo experimental. Valor de P obtido após teste t para amostras pareadas. Os graus de liberdade são dependentes do número de ensaios realizados, indicado entre parênteses.	37

ABSTRACT

Panstrongylus megistus stands out by its high potential as a vector of Chagas' disease. Preceding work described volatile compounds in faeces of *P.megistus* that probably act as chemical marks for finding shelters. Some authors suggested the existence of repellence between *P.megistus* and *Triatoma infestans* mediated by their faeces, their pheromones and the presence of bugs. However, it was later demonstrated that both *P.megistus* and *T.infestans* are attracted by the chemical signals from faeces and also from cuticle (footprints) of the other species. In this work, we tested the aggregation of *P.megistus* to five volatile compounds present in their faeces and determined the relationship between dose and behavioural response for each of these substances. Afterwards, we developed a blend of volatiles capable of recruiting *P.megistus* to shelters. We still analyzed whether the density of insects and the presence or absence of a light cycle could influence the use of shelters by *P.megistus* and *T.infestans*. Finally, we evaluated if *P.megistus* and *T.infestans* aggregate or repel themselves inside shelters. *P.megistus* was attracted to 10 µg and 100 µg of acetic acid, 1 ng and 10 µg of hexanoic acid, 10 µg and 100 µg of acetamide and 100 ng of isovaleric acid, while it was repelled by 10 µg of 2,3-butanediol. The blend of 10 ng of the five substances revealed to be attractive to the insects. Shelters impregnated with 160 ng or 1.6 µg of the five compounds were more attractive than clean ones. We demonstrated that the density of insects and the presence of a light cycle significantly affected the use of shelters by both species. However, we observed clear differences between the behavioural patterns of these species. *P.megistus* was more sensible to the effect of density, while *T.infestans* was apparently more sensible to the effect of illumination. We showed that *T.infestans* and *P.megistus* aggregate randomly between two available shelters. Moreover, they aggregated together inside both the shelters, without revealing any process of mutual repellence. We propose that the blend of volatiles identified in the faeces of these bugs could be used for the formulation of bait for triatomine detection devices used in control programs. The studies about the interaction between *P.megistus* and *T.infestans* inside shelters help us to understand the behavioural patterns of each species and intend to clarify the conflicting results reported in the previous literature about triatomines.

Keywords: triatomines, behaviour, aggregation and pheromones.

Panstrongylus megistus se destaca pelo seu alto potencial para transmissão da doença de Chagas. Estudos prévios descreveram compostos voláteis presentes nas fezes de *P.megistus* que provavelmente servem como marca química do abrigo. Alguns autores sugerem a existência de repelência mútua entre *P.megistus* e *Triatoma infestans* mediada pelas suas fezes, feromônios e pela sua própria presença. Entretanto, foi demonstrada uma resposta de agregação interespecífica a sinais químicos das fezes e da cutícula para *T.infestans* e *P.megistus*. Neste trabalho testamos a atração de *P.megistus* a cinco compostos identificados nas suas fezes e determinamos a relação dose-resposta comportamental para cada composto. Posteriormente foi desenvolvida uma mistura de substâncias voláteis capaz de recrutar *P.megistus* para o interior de abrigos. Analisamos ainda como a densidade de insetos e a presença ou não de ciclo de iluminação influenciam no uso dos abrigos em *P.megistus* e *T.infestans*. Finalmente avaliamos se existe agregação ou repelência interespecífica no interior de abrigos entre *P.megistus* e *T.infestans*. Houve atração de *P.megistus* pelas doses de 10 µg e 100 µg de ácido acético, 1 ng e 10 µg de ácido hexanóico, 10 µg e 100 µg de acetamida e 100 ng de ácido isovalérico. Por outro lado, observou-se uma resposta de rejeição à dose de 10 µg de 2,3-butanodiol. Uma mistura contendo 10 ng de cada uma destas substâncias mostrou-se atraente. Abrigos impregnados com 160 ng ou 1.6 µg de cada composto mostraram-se mais atrativos do que abrigos limpos. Demonstramos que a densidade de insetos e o ciclo de iluminação interferem significativamente no uso do abrigo para ambas as espécies estudadas. Entretanto existem diferenças no padrão de comportamento das espécies, sendo *P.megistus* mais sensível ao efeito da densidade e *T.infestans* aparentemente mais sensível ao efeito da iluminação. Vimos que *T.infestans* e *P.megistus* se agregam aleatoriamente entre dois abrigos disponíveis. Além disso, as duas espécies se agregam de maneira conjunta nos dois abrigos, sem revelarem qualquer processo de repelência mútua. Propomos que a mistura de voláteis identificados nas fezes poderia ser utilizada na formulação de iscas para dispositivos de detecção destes insetos em programas de controle. Os estudos sobre a interação entre *P.megistus* e *T.infestans* no contexto de utilização de abrigos poderão ajudar na compreensão dos padrões comportamentais de cada espécie e pretendem por fim nas discordâncias existentes na literatura sobre triatomíneos.

Palavras-chave: triatomíneo, comportamento, agregação e feromônio.

A doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é um dos principais problemas de saúde pública no continente americano. Esta zoonose, endêmica em 21 países da América Latina, afeta de 16 a 18 milhões de pessoas, enquanto outros 120 milhões (25% da população da América Latina) vivem em áreas sob risco de contrair a doença (WHO 2005). No Brasil, estima-se que mais de quatro milhões de pessoas estejam infectadas (Vinhaes & Dias 2000).

O agente etiológico da doença, *Trypanosoma cruzi* Chagas (1909) é transmitido aos humanos através das fezes de triatomíneos infectados, depositadas na pele do hospedeiro no momento da picada (WHO 2005). A infecção pode também acontecer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou via transplacentária da mãe para o feto. *T.cruzi* pode ainda ser transmitido por via oral, por exemplo, através da ingestão de alimento contaminado com fezes de triatomíneos. Entretanto, a transmissão vetorial é a mais importante, sendo responsável por cerca de 80% de todos os casos da doença (Schofield 1994, Schofield & Dias 1999).

Originalmente, o ciclo do *T.cruzi* estava restrito a habitats silvestres (Sherlock 1979). Na medida em que o homem invadiu o ambiente silvestre, o ciclo parasitário passou a incluir também hospedeiros do ambiente peridomiciliar e dos domicílios humanos. Esta inclusão aconteceu como consequência do contato freqüente destes hospedeiros, animais domésticos e seres humanos, com triatomíneos infectados.

O desenvolvimento de colônias destes insetos vetores nos ambientes humanos foi favorecido pela fartura de oferta de alimentos e pela abundância de abrigos disponíveis, principalmente em moradias de baixa qualidade. De fato, a domicialização dos triatomíneos ocorre especialmente em áreas onde o tipo de habitação é de acabamento precário, como nas chamadas casas de taipa. Sendo assim, a importância desta doença está condicionada aos problemas sócio-econômicos e aumenta na medida em que se aprofundam os níveis de pobreza (Fichera et al. 1997).

A doença apresenta duas fases sucessivas, fase aguda e fase crônica. A fase aguda dura de seis a oito semanas, possui sintomas ou sinais quase sempre inespecíficos quando presentes. Uma vez terminada esta fase, a maioria dos pacientes aparentam-se saudáveis e nenhum dano ao organismo pode ser percebido nos diagnósticos clínicos. Porém, após alguns anos de iniciada a fase

crônica, 20% a 35% das pessoas infectadas desenvolvem lesões irreversíveis do sistema nervoso autônomo do coração, esôfago, cólon e do sistema nervoso periférico (Moncayo 1999, Pুনukollu et al. 2004).

Como não há vacina disponível ou tratamento específico para intervenções em larga escala na saúde pública, a principal estratégia é a prevenção da transmissão através da eliminação de triatomíneos vetores domiciliados. Nesse contexto, onde o controle da doença se faz principalmente através do combate ao vetor, um maior conhecimento do comportamento e particularidades das espécies com relevância epidemiológica torna-se essencial. Uma compreensão mais profunda das capacidades sensoriais destes insetos e do uso que fazem da informação do ambiente pode contribuir, sem dúvida, para o desenvolvimento de novas estratégias e ferramentas de controle.

Os triatomíneos como vetores da doença de Chagas

Os triatomíneos são hemípteros (Ordem Hemiptera), pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Das 136 espécies distribuídas em 18 gêneros e 6 tribos da subfamília Triatominae, 125 espécies de 17 gêneros e 4 tribos ocorrem no continente americano entre as latitudes 42N e 46S (Schofield 1994, Galvão et al. 2003, Forero et al. 2004, Poinar Jr 2005). Estes insetos são hemimetábolos, sendo que o ciclo de desenvolvimento é constituído de cinco estádios ninfais seguidos pela fase adulta, a partir da qual adquirem asas e aparelho reprodutor, dentre outras características. Os triatomíneos são exclusivamente hematófagos em todas as fases da vida, tendo como principais hospedeiros os vertebrados endotérmicos.

A maioria das espécies ocupa habitats principalmente silvestres, onde vivem em estreita associação com seus hospedeiros vertebrados. Entretanto, várias espécies de triatomíneos também invadem e colonizam o peridomicílio e o domicílio humanos, principalmente nas áreas onde ocorreu ação de degradação dos seus habitats naturais. Diante dessas condições, algumas espécies de triatomíneos tornam-se extremamente sinantrópicas, enquanto outras, com sinantropia parcial, ocupam os ambientes domiciliares, mas preservam populações silvestres no ambiente natural (Zeledón & Rabinovich 1981). Especialmente em áreas rurais, os triatomíneos encontram abrigos favoráveis em frestas nas paredes e telhados de casas, ou em anexos peridomiciliares, como galinheiros e chiqueiros. Nesta situação, o homem e seus animais domésticos atuam como fontes de repastos sanguíneos

para os insetos. Como consequência, os triatomíneos podem transmitir a estes o *T. cruzi*, caso estejam infectados.

É preciso ressaltar que os triatomíneos são capazes de transmitir o *T. cruzi* em todos os estádios de seu desenvolvimento, mantendo a infecção por toda a vida. Entretanto, não ocorre transmissão transovariana do *T. cruzi* nesses insetos. Dessa forma, toda ninfa de primeiro estágio que eclode do ovo não está infectada e, somente após obter repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, adquire o parasito (Schofield 1994).

Como dito anteriormente, a principal estratégia de controle da doença de Chagas está no combate aos triatomíneos no peridomicílio e intradomicílio. Atividades de borrifação das habitações com inseticidas de ação residual, iniciadas na década de 1960 alcançaram sua máxima eficácia nos anos 80. No Brasil, a partir de 1986 o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH) sofreu uma redução das atividades por conta do surgimento de epidemias de dengue. Ainda assim, as atividades de borrifação foram mantidas em amplas áreas do Brasil (Dias 2002).

Em 1991, com a Iniciativa dos Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai), o PCDCH passou a priorizar as áreas de ocorrência de *Triatoma infestans* (Klüg, 1834), considerado o principal vetor doméstico da doença nessa região. Nas áreas em que o controle da transmissão vetorial já se encontrava em fase avançada, um processo denominado vigilância epidemiológica era implantado (Dias et al. 2002, WHO 2005). Em áreas sob vigilância epidemiológica, realizam-se inspeções manuais regulares para detectar a presença de focos residuais ou processos de re-infestação por triatomíneos no peri e intradomicílio (SUCAM 1980). Além disso, postos de informação são instalados para receberem notificações do encontro domiciliar de triatomíneos pelos moradores locais (SUCAM 1980).

A iniciativa dos Países do Cone Sul mostrou-se muito eficaz. Até o presente momento, declararam-se livres da transmissão vetorial o Uruguai e o Chile em 1997 e 1999, respectivamente (WHO 2005). No Brasil, obteve-se a eliminação de *T. infestans* em amplas áreas e consequentemente a virtual interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas (Dias 2002).

Apesar do relativo sucesso na erradicação de *T. infestans* no Uruguai, Chile e na maior parte do Brasil, espécies de triatomíneos autóctones exigem estratégias de controle adaptadas às diferentes condições. Nesses casos faz-se necessária a

existência de um programa de controle mais eficiente, baseado principalmente na constante detecção e eliminação de insetos intra e peridomiciliares, visto que a existência de populações silvestres promove a reinfestação quase permanente das habitações.

A relevância epidemiológica de *Triatoma infestans*

T. infestans (**Figura 1**) é o principal vetor da doença de Chagas na América do Sul. Datações históricas combinadas com técnicas de análise genética indicam que esta espécie provavelmente se originou nas regiões de Cochabamba e Sucre (Dujardin et al. 1997), região central da Bolívia, único país onde populações silvestres dessa espécie têm sido encontradas. A partir daí se dispersou passivamente para o Paraguai, Argentina, Uruguai, Peru, Chile e Brasil.

A dispersão de *T. infestans* até atingir a ampla distribuição que possui atualmente (**Figura 2**) parece ser relativamente recente e associada principalmente a processos de migração humana (Schofield 1988). *T. infestans* foi introduzido no Brasil via Argentina e Paraguai, provavelmente entre as bagagens de imigrantes (Aragão 1971). Até os anos 30 não houve relato da ocorrência de *T. infestans* em Minas Gerais e somente nos anos 70 a espécie atingiu seu limite máximo de distribuição no Nordeste brasileiro (Barrett et al. 1979). No Brasil a espécie sempre ocupou exclusivamente nichos domiciliares (WHO 2005).

T. infestans é extremamente bem adaptado aos ecótopos oferecidos pelas habitações rurais. Devido às altas densidades de infestação domiciliar e taxas de prevalência da doença de Chagas associadas à ocorrência da espécie, *T. infestans* chegou a ser considerado o triatomíneo epidemiologicamente mais importante no Brasil, mesmo não sendo autóctone (Schofield & Dias 1999).

Alguns fatores tornam *T. infestans* altamente susceptível às ações de controle nos países onde não é autóctone. Nestes países, como é o caso do Brasil, após haver uma cobertura completa dos domicílios rurais com inseticida, não existem populações silvestres que atuem como fontes de insetos invasores e a eliminação da espécie torna-se possível. Alguns autores sugerem que determinados aspectos particulares da espécie contribuem ainda mais para essa susceptibilidade do *T. infestans*. Entre eles, o número limitado de habitats nos quais se encontra (com todos os estádios confinados a ambientes intra ou peridomiciliares); sua extrema especialização, sua baixa velocidade de recombinação genética e baixa

variabilidade genética (Schofield & Dias 1999).



Figura 1. *Triatoma infestans* Klüg 1834. Fonte: icb.usp.br/~marcelcp

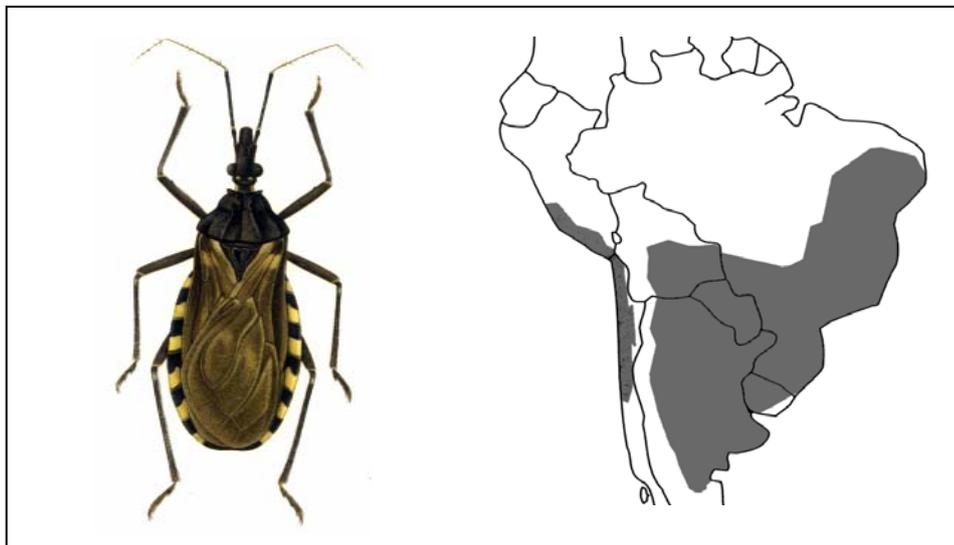


Figura 2. Área geográfica onde *T.infestans* já foi detectado. Fonte: Schofield 1994

Devido a essas características, a expansão do Programa de Controle Vetorial implementado pela SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde) no início da década de 80 eliminou *T.infestans* de vastas áreas em nosso país (Schofield & Dias 1999).

Com o avanço do programa de eliminação do *T.infestans* dos países do Cone Sul, outras espécies de importância epidemiológica demandam o esclarecimento de aspectos do seu comportamento que possam subsidiar o seu controle, principalmente aquelas que são originárias de ecotopos silvestres e possuem alta capacidade de invasão e colonização do ambiente artificial. Entre estas espécies, destaca-se *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) em função do seu grande potencial vetorial, da sua capacidade de desenvolvimento de colônias intra e peridomiciliares em altas densidades e estreita associação aos hospedeiros domiciliares, entre eles o homem (Forattini 1980).

A relevância Epidemiológica de *Panstrongylus megistus*

P.megistus (**Figura 3**) foi a espécie de triatomíneo originalmente assinalada como vetor de *T.cruzi* por Carlos Chagas (1909), quando descrito pela primeira vez o ciclo completo da tripanossomíase americana. Esta espécie possui grande importância epidemiológica no Centro, Leste e Sudeste do Brasil e provavelmente teve sua origem em florestas do ambiente tropical atlântico, caracterizadas por altos níveis de umidade (Forattini 1980).

No Brasil sua distribuição se estende do Maranhão a Santa Catarina (**Figura 4**), ocorrendo em praticamente todos os tipos de florestas extra-amazônicas existentes, onde as condições de clima possibilitaram a presença de coberturas vegetais densas (Aragão 1961, Forattini 1980). Em Minas Gerais, Bahia, Alagoas e Pernambuco *P.megistus* é a principal espécie autóctone transmissora de *T.cruzi* (Forattini, 1980). Fora do Brasil, a espécie já foi encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (Carcavallo et al. 1999) (**Figura 4**). Levando-se em conta sua área de distribuição, sugere-se que *P.megistus* exige um teor mínimo de umidade no ambiente como fator necessário para sua sobrevivência, sendo a aridez um elemento climático capaz de exercer ação limitante sobre sua dispersão (Aragão 1961, Forattini 1980).



Figura 3. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). Fonte: icb.usp.br/~marcelcp

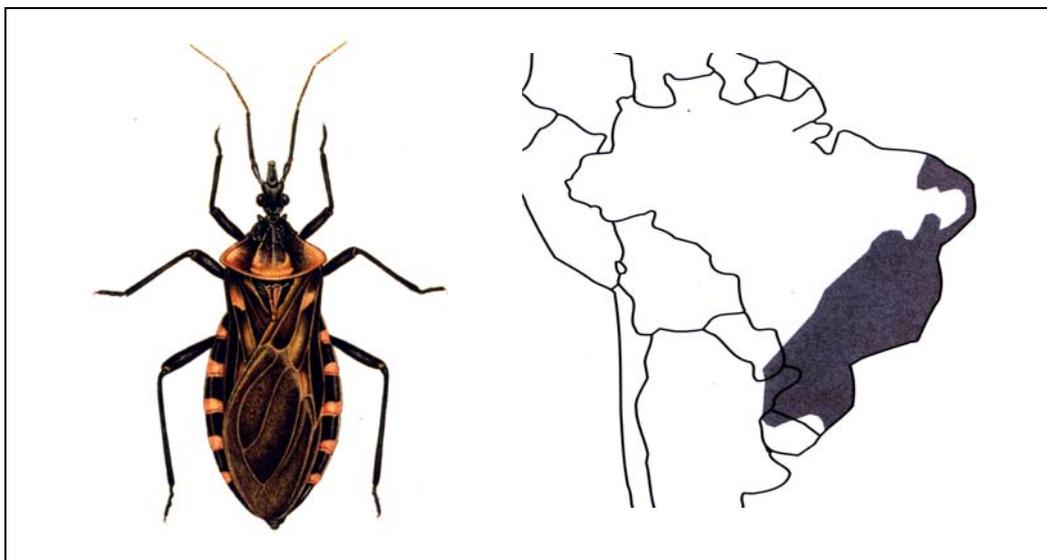


Figura 4. Área geográfica onde *P. megistus* já foi detectado. Fonte: Schofield 1994

No ambiente silvestre, *P.megistus* já foi encontrado em diversos ecótopos, principalmente em anfractuosidades de troncos de árvores, espaços entre raízes de árvores, touceiras de bromélias epífitas e terrestres, cavidades no solo ou rochas, tufos densos de vegetação, copas de palmeiras. Nesses ecótopos, os insetos desta espécie convivem principalmente com gambás, cuícas, morcegos e roedores silvestres, além de numerosas aves (Barretto 1979).

O processo de domicialização de *P.megistus* provavelmente teve origem a partir da destruição ou modificação de seus habitats silvestres, associado à instalação nesses ambientes de habitações humanas de condições precárias (Forattini 1980, Forattini et al 1981). Estes fatores, adicionados ao evidente ecletismo alimentar da espécie, facilitaram a sua entrada e colonização nos ambientes artificiais. Nesses novos ambientes, os insetos encontram condições semelhantes às dos seus ecótopos naturais, como abrigos adequados e alimentação, ficando o sucesso desta colonização condicionado à persistência destes fatores (Forattini 1980).

Com a destruição da Mata Atlântica, matas ou 'manchas' residuais da vegetação original podem constituir focos de abrigo e manutenção de populações silvestres de *P.megistus*, podendo os indivíduos destas populações dispersarem-se para ambientes artificiais (Forratini et al. 1977a, 1977c, 1978). Como já mencionado, a alimentação nestes ambientes normalmente é farta, representada pelos humanos e seus animais domésticos (Aragão 1961). Deve ser ressaltada a importância do peridomicílio na domicialização destes triatomíneos, já que nele os insetos desenvolvem colônias com densidades muito mais elevadas que as normalmente observadas em seus ambientes naturais, devido não só à fartura de alimento, mas também aos variados abrigos existentes (Diotaiuti et al. 1994).

Acredita-se que a colonização de habitações isoladas possa ser devida, em parte, ao transporte passivo destes insetos entre bagagens de pessoas ou arreios de animais. A distâncias menores, os insetos adultos podem se dispersar ativamente mediante o vôo (Miles 1976). Frequentemente são observados adultos invadindo casas, em especial no período chuvoso (Dias & Dias 1968). Aparentemente esses adultos são atraídos pela luminosidade (Forattini 1980). De acordo com Forattini et al. (1977a, 1979), o desenvolvimento de *P.megistus* na natureza segue ciclos anuais bem determinados. No período de setembro a dezembro tem sido observada a maior emergência de adultos desta espécie (Dias & Zeledón 1955, Dias & Dias 1968).

Segundo Forattini et al. (1977a, 1977b, 1977c), são as fêmeas as mais propensas a dispersarem-se através do vôo, provavelmente na tentativa de iniciarem novas colônias.

A identificação do conteúdo estomacal de *P. megistus* capturados em ambiente domiciliar revela elevada porcentagem de sangue humano (Minter 1976). Já em insetos capturados em ecótopos peridomiciliares, tem sido detectado principalmente sangue de aves (Sherlock 1979). Devido às altas taxas de infecção pelo *T. cruzi*, tendo sido o índice global para o Brasil de 3,4%, *P. megistus* foi considerado durante muito tempo o principal vetor da doença de Chagas no país (Castro Filho & Silveira 1979).

Ao longo de sua área de distribuição geográfica, *P. megistus* assume importância epidemiológica variável de acordo com a região (Di Primo 1955). Em áreas mais preservadas a espécie não mostra uma tendência a invadir os biótopos artificiais (Forattini et al. 1978, 1979). Esta característica tem sido observada no ecossistema da Serra do Mar, onde os insetos são encontrados habitando ecótopos naturais, dificilmente abandonando-os para domiciliar-se (Forattini 1972, Forattini et al. 1982). Já em áreas onde ocorreu a destruição de seu ambiente natural, a espécie passa a ser encontrada em ambientes artificiais, como observado em Minas Gerais, São Paulo e Bahia.

Forattini et al. (1978) acreditam ser a porção meridional da região Sudeste do Brasil a possível zona de transição entre os dois diferentes comportamentos assumidos por *P. megistus*: invasivo ou não invasivo. A presença ou ausência de domiciliação foi delimitada geograficamente por uma linha imaginária que percorre o Norte-Nordeste do Estado de São Paulo. Ao norte desta linha, além dos ecótopos silvestres, a espécie é altamente adaptada ao peri e intradomicílio, assumindo assim grande importância epidemiológica, como claramente observado na Bahia e Minas Gerais. Ao sul deste limite, que corresponde principalmente ao sul do Brasil, a espécie pode ser encontrada no habitat silvestre, sendo ocasional e em densidades reduzidas seu encontro dentro das casas (Pessoa 1962, Forattini 1980, Forattini et al. 1982).

Estudos de biologia molecular revelaram uma grande heterogeneidade genética entre as diferentes populações brasileiras de *P. megistus*, mostrando uma clara separação geográfica entre as mesmas (Barbosa, 2004). Além disso, a separação dessas populações está relacionada aos domínios morfoclimáticos na área de ocorrência da espécie e ainda aos dados biogeográficos de cada região do

Brasil (Barbosa, 2004).

Até a chegada de *T.infestans* no Brasil pelas correntes de migração nas décadas de 30 e 40, *P.megistus* foi certamente o principal vetor da doença de Chagas nas áreas já citadas (Dias 1965, Dias 1982, Aragão 1971, Silva et al. 1971). Após a erradicação de *T.infestans* pelas atividades de borrifação com inseticidas, *P.megistus* foi reconduzido à sua categoria de principal espécie vetora em vasta área do Brasil. O processo de reinfestação das casas por populações silvestres constitui, no contexto atual, o principal problema no controle da doença de Chagas. Devido a este fato, informações sobre o comportamento e fisiologia de *P.megistus* poderão oferecer importantes ferramentas para o seu controle nas atuais condições epidemiológicas e operacionais.

A comunicação química em triatomíneos

O processo de obtenção de informação, através dos órgãos sensoriais, é de fundamental importância para a sobrevivência dos seres vivos. Estas informações têm origem no meio ambiente, incluindo indivíduos da mesma ou de outras espécies, ou ainda fatores abióticos. A troca de informação entre indivíduos de uma mesma espécie é um processo denominado comunicação. O tipo de comunicação depende do canal sensorial envolvido nesta. Sinais visuais, tácteis, auditivos e químicos são utilizados como mediadores da comunicação, e, portanto, do comportamento. Estruturas especializadas, os órgãos sensoriais, evoluíram para receber tais sinais com alta especificidade e sensibilidade e traduzi-los em linguagem neurofisiológica (Chapman 1998).

Entre as formas de comunicação utilizadas pelos seres vivos podemos destacar a comunicação química, que ocorre quando a transmissão de informação se dá mediante a emissão de compostos químicos, desde a fonte até o receptor, mediando numerosas respostas tanto fisiológicas como comportamentais. Entre os vários grupos animais, os insetos provavelmente são os que mais dependem da comunicação química para desempenhar suas atividades comportamentais (Birch & Haynes 1982).

As substâncias químicas relevantes na obtenção de informações pelos organismos são denominadas *infoquímicos* (Dicke & Sabelis 1988). O termo *infoquímico* pode ser definido como uma substância química que fornece informação na interação entre dois indivíduos, provocando um comportamento ou resposta

fisiológica específica. Os infoquímicos podem ser classificados com base no tipo de interação. Se a interação é intraespecífica denominam-se feromônios. Se a interação ocorre entre dois indivíduos de espécies diferentes, os infoquímicos são denominados *aleloquímicos*. O aleloquímico pode ainda ser classificado com base nos custos e benefícios que cada organismo obtém da interação. Dentro desta classificação usam-se os termos alomônio (positivo para o emissor e prejudicial para o receptor), cairomônio (positivo para o receptor e prejudicial para o emissor) ou sinomônio (positivo para ambos, emissor e receptor).

Em triatomíneos o uso de infoquímicos pode estar relacionado com o reconhecimento e localização de hospedeiros, encontro de possíveis parceiros para o acasalamento, defesa, comportamento de agregação e busca de refúgios (Schofield & Patterson 1977, Núñez 1987, Lorenzo Figueiras et al. 1994, Manrique & Lazzari 1995, Lorenzo & Lazzari 1996, Taneja & Guerin 1995, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998).

Estes insetos demonstram uma resposta anemotática característica, ou seja, orientam-se contra o fluxo de ar quando confrontados com correntes de ar que carregam certos odores associados ao hospedeiro (Núñez 1982, 1987, Taneja & Guerin 1995, 1997, Barrozo 2003, Barrozo 2004, Barrozo et al. 2004). Atração ao CO₂ foi demonstrada em *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Núñez 1982, Taneja & Guerin 1995) e *T. infestans* (Taneja & Guerin 1995, 1997, Barrozo et al. 2003, Barrozo et al. 2004). A atração de *T. infestans* ao ácido láctico foi observada quando associado ao CO₂ (Barrozo 2003). Guerenstein & Guerin (2001), utilizando um compensador de marcha, demonstraram que correntes de ar que apresentavam ácido isobutírico e/ou nonanal eram capazes de modificar o comportamento de *T. infestans*. Barrozo (2003) demonstrou através de eletroantenografia que *T. infestans* apresenta respostas eletrofisiológicas ao ácido láctico, 1-octen-3-ol e ácidos graxos, sendo estas respostas dose dependentes. Além disso, esse autor demonstrou a existência de anemotaxia negativa em *T. infestans* frente a correntes de ar que apresentam 1-octen-3-ol e também frente a misturas de ácidos graxos de cadeia curta (ácido propanóico, ácido butírico e ácido valérico) com ácido láctico.

Vários trabalhos sugerem o uso de sinais químicos no contexto sexual em triatomíneos (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1995, de Brito Sánchez et al. 1995). Os estudos de comportamento sexual, tanto em *T. infestans* quanto em *R. prolixus*, sugerem que existe um sinal sexual químico emitido durante a cópula por um ou ambos os sexos, que promove a agregação de machos em torno do casal em

cópula (Baldwin et al. 1971, Manrique & Lazzari 1995, Pires 2004).

Aparentemente os triatomíneos fazem também o uso de odores como mecanismo de defesa. Quando os triatomíneos são perturbados liberam um odor característico das glândulas de Brindley. O componente majoritário deste odor, o ácido isobutírico, quando aplicado topicamente em ninfas de *R.prolixus*, causa paralisação dos insetos (Kalin & Barret 1975). Barret (1976) sugeriu que o ácido isobutírico também funcionaria como feromônio de alarme. Kalin & Barret (1975) obtiveram evidências de que esse composto teria essa função quando testaram a resposta de adultos de *R.prolixus* ao ácido isobutírico em olfatômetros e observaram rápida dispersão dos insetos e ruptura do equilíbrio de agregação. Schofield (1979) observou que baixas concentrações de ácido isobutírico atraíam adultos de *R.prolixus*, enquanto altas concentrações os repeliam. Uma função similar foi sugerida para 3-metil-2-hexanona, um composto da secreção das glândulas metasternais de *Dipetalogaster maximus* (Rossiter & Staddon 1983).

A presença de um sinal químico de agregação nas fezes de triatomíneos já foi relatada para diversas espécies (Schofield & Patterson 1977, Ondarza et al. 1986, Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras et al. 1994, Lorenzo & Lazzari 1996, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002b; Vitta et al. 2002, Pires et al. 2002). Um segundo sinal de agregação, denominado *footprints*, está presente na cutícula de *T.infestans* (Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998) *P.megistus* (Pires et al. 2002) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola 1964 (Vitta et al. 2002) e promove agregação somente através do contato químico. Diferentes autores demonstraram respostas de agregação interespecífica promovidas pelos sinais presentes nas fezes e na cutícula de ninfas e adultos de várias espécies de triatomíneos (Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002a, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002b, Pires et al. 2002; Vitta et al. submetido). A composição química dos sinais de agregação ainda não está bem esclarecida. Embora alguns autores tenham descrito substâncias presentes nas fezes de triatomíneos (Cruz-López & Morgan 1995, Taneja & Guerin 1997), nenhum deles demonstrou uma atividade de atração dos insetos frente a esses compostos.

Lorenzo & Lazzari (1996) sugeriram que substâncias voláteis presentes nas fezes de *T.infestans* atuam como marcas químicas que permitem a orientação dos insetos até os abrigos. Reisenman et al. (2000) estudaram a interação entre os estímulos visuais e químicos na agregação de *T.infestans* em abrigos. Esses autores demonstraram que o comportamento de agregação em abrigos é modulado pela

convergência entre o tipo de luz espectral associada ao abrigo e os sinais químicos liberados pelas fezes.

No presente trabalho avaliamos o comportamento de *P.megistus* frente a diferentes substâncias voláteis identificadas nas suas fezes e o potencial destes sinais químicos na orientação dos insetos para o interior de abrigos. Além disso, estudamos em *P.megistus* e *T.infestans* alguns fatores que influenciam no uso dos abrigos, como a densidade de insetos e a iluminação. Finalmente, avaliamos se *P.megistus* e *T.infestans* se agregam ou se repelem no interior de abrigos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o comportamento de *P.megistus* frente a diferentes substâncias voláteis identificadas nas suas fezes e avaliar a interação entre *P.megistus* e *T.infestans* no interior de abrigos.

Objetivos Específicos

1. Testar, através de experimentos de comportamento, a relação dose-resposta de atração de *P.megistus* para as diferentes substâncias identificadas nas suas fezes.
2. Desenvolver uma mistura das substâncias potencialmente atrativas para *P.megistus*.
3. Testar se *P.megistus* prefere ocupar abrigos artificiais impregnados com a mistura das substâncias.
4. Analisar comparativamente em *P.megistus* e *T.infestans* a influência da densidade de insetos na escolha e uso do abrigo.
5. Analisar comparativamente em *P.megistus* e *T.infestans* a influência da iluminação na escolha e uso do abrigo.
6. Avaliar a existência de agregação ou repelência no interior de abrigos entre *T.infestans* e *P.megistus*.
7. Avaliar se a presença prévia de uma espécie no abrigo pode afetar a entrada da outra espécie.

CAPÍTULO 1:
Atração às fezes em *Panstrongylus megistus*

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O comportamento de agregação em triatomíneos

O comportamento de agregação tem significantes implicações na ecologia dos animais, tanto no nível individual quanto nas interações de ordem maior. Esse comportamento pode ser mediado por sinais visuais, tácteis, auditivos ou químicos (Wertheim 2005). Adultos e ninfas de triatomíneos encontram-se agregados em abrigos durante as horas de luz do ciclo diário (Lazzari 1992). Diferentes trabalhos sobre a agregação em triatomíneos reportam evidências do uso de sinais químicos como mediadores da resposta de agregação.

Schofield & Patterson (1977) sugerem a existência de um feromônio juvenil de agregação em fezes de ninfas de *T.infestans* e *R.prolixus*. Ondarza et al. (1986) estudando *Triatoma mazzottii* Usinger, 1941 sugeriram a existência de um feromônio de agregação em fezes de ninfas e fêmeas atuando na atração destas quando em jejum, e outro presente nas fezes dos machos que atuaria na atração destes alimentados ou em jejum.

Vários outros trabalhos têm demonstrado a existência de agregação promovida pelas fezes de diversas espécies de triatomíneos. Cruz-López et al. (1993) identificaram a existência de comportamento de agregação mediado pelas fezes em *T.mazzotti*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma barberi* e *R.prolixus*. O comportamento de agregação mediado por fezes foi detalhadamente estudado em *T.infestans* (Lorenzo Figueiras et al. 1994, Lorenzo & Lazzari 1996). Lorenzo Figueiras & Lazzari (2002b) observaram que *Triatoma sordida* (Stål, 1859) e *Triatoma guasayana* Wygodzinnsky & Abalos, 1949 também possuem um sinal de agregação fecal. A atração de insetos às suas próprias fezes foi ainda demonstrada em *T.pseudomaculata* (Vitta et al. 2002), *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Vitta et al. submetido) e *P.megistus* (Pires et al. 2002).

Um segundo tipo de sinal de agregação foi encontrado na cutícula de alguns triatomíneos e denominado “footprints” (Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998). Esses autores observaram que *T.infestans* agrega-se frente a papeis de filtro previamente impregnados com substâncias da cutícula (footprints) de outros exemplares desta espécie. A agregação destas ninfas demonstra a existência de mediação química por substâncias presentes na cutícula destes insetos. Resultado semelhante foi observado por Pires et al. (2002) estudando *P.megistus*. A existência de um sinal cuticular foi também confirmada para *T.pseudomaculata* (Vitta et al. 2002).

O sinal de agregação das fezes é volátil e, portanto, atua a distância podendo

ser transportado por correntes de ar (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Quanto à função do sinal de agregação fecal, Schofield & Patterson (1977) sugerem que este poderia servir para indicar aos insetos a presença de abrigos adequados ou ainda a presença de uma fonte de alimentação.

Lorenzo & Lazzari (1996) observaram uma maior tendência de *T.infestans* a defecar nos acessos dos seus abrigos e demonstraram preferência desta espécie por abrigos associados a fezes. Esses autores demonstraram a existência de um padrão específico de distribuição das deposições fecais em relação ao abrigo e sugeriram que as fezes atuam como marca química que permite a orientação dos insetos até os refúgios. Foi descrito um padrão de comportamento estereotipado através do qual *T.infestans* deposita e acumula suas fezes nos acessos do abrigo (**Figura 5**). O inseto sai do refúgio, gira 180° e caminha vários centímetros para trás, então pára para defecar e depois retorna ao refúgio. Todo o processo dura cerca de 20 segundos. Em estudos realizados no nosso laboratório (Barezani, comunicação pessoal) observamos que *P.megistus* também possui um padrão específico de distribuição das marcas fecais em relação aos abrigos e que também parece utilizar as fezes como marca química do abrigo.

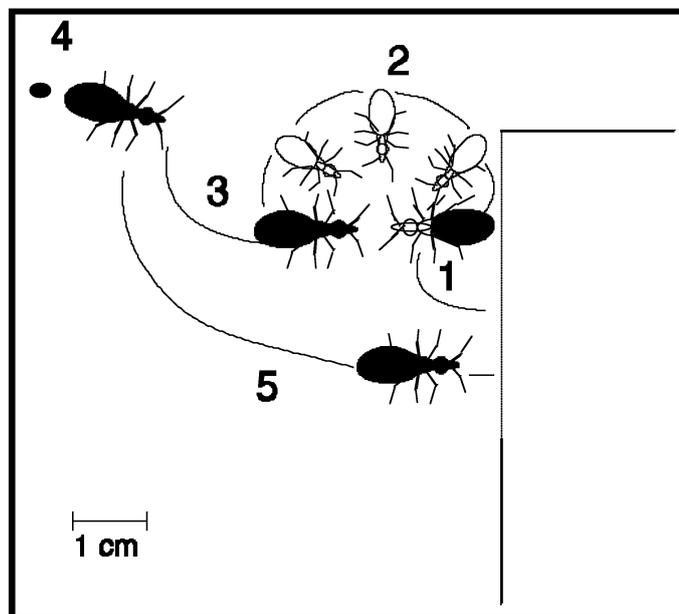


Figura 5. Comportamento de defecação de *T.infestans* em relação ao abrigo. O inseto sai do abrigo (1), vira 180° (2) e caminha para trás vários centímetros (3), para e defeca (4), depois retorna ao abrigo. Todo esse procedimento dura cerca de 20 segundos. Fonte: Lorenzo & Lazzari 1996.

Lorenzo Figueiras et al. (1994) observaram atração de ninfas de *T.infestans* às fezes somente após 3 horas da sua deposição, quando as fezes já estavam secas. Em contraste, fezes recém depositadas, quando ainda frescas, não promoveram o comportamento de agregação de *T.infestans* e ainda induziram uma rejeição significativa (Lorenzo Figueiras et al. 1994). A atratividade das fezes persiste por cerca de 10 dias após a sua deposição e pode ser recuperada após esse período por reidratação (Lorenzo Figueiras & Lazzari 2000).

A resposta dos triatomíneos ao sinal de agregação fecal varia de acordo com o tempo transcorrido após alimentação. Schofield and Patterson (1977) mostraram que ninfas recém alimentadas de *T.infestans* e *R.prolixus* não são atraídas pelas fezes. O comportamento de atração às fezes começa a ser observado em *T.infestans* somente cerca de 8 horas após alimentação (Lorenzo Figueiras & Lazzari 2000). Finalmente, um ritmo espontâneo de agregação/dispersão foi demonstrado, ocorrendo resposta máxima de agregação mediada por fezes no início da fotofase (alvorecer) e resposta máxima de dispersão no início da escotofase (entardecer) (Lorenzo Figueiras et al. 1994).

A aparente falta de especificidade do sinal de agregação das fezes de algumas espécies de triatomíneos foi descrita inicialmente por Cruz-López et al. (1993) que reportou agregação interespecífica promovida pelo sinal das fezes entre cinco espécies da subfamília Triatominae (*Triatoma mazzotti*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma barberi* e *R.prolixus*). Lorenzo Figueiras & Lazzari (2002a) mostraram que as fezes de *R.prolixus* induzem a atração de ninfas de *T.infestans*, entretanto as fezes de *T.infestans* não são capazes de atrair ninfas de *R.prolixus*. Lorenzo Figueiras and Lazzari (2002b) ao estudar a agregação interespecífica entre *T.infestans*, *T.sordida* e *T.guasayana*, demonstraram que cada uma das três espécies se agrega às fezes das outras duas espécies, com exceção de *T.guasayana*, que não mostrou atração pelas fezes de *T.sordida*. Pires et al. (2002) demonstraram a existência de agregação interespecífica promovida pelo sinal das fezes entre *T.infestans* e *P.megistus*. Todos esses dados sugerem que ao menos em parte, o sinal de agregação das fezes de triatomíneos possui uma constituição química comum nas diferentes espécies.

No que se refere à natureza química do sinal de agregação das fezes, Cruz-López & Morgan (1995) analisaram as fezes de *T.mazzoti* e *T.infestans* e descreveram quatro substâncias majoritárias (*o*-aminoacetofenona, 4-metilquinazolina, 2,4-dimetilquinazolina e 2-pirrolidinona). Entretanto, quando

testada a capacidade para promover a agregação dos insetos em concentrações entre 0.1 e 100 ng, nenhuma dessas substâncias ou misturas das mesmas foi capaz de promover tais respostas (Cruz-López & Morgan 1995).

Taneja & Guerin (1997) reportaram que papéis de filtro impregnados com fezes de triatomíneos e posteriormente umidificados liberam amônia e que este composto é capaz de atrair *T.infestans*. Entretanto duas questões devem ser levantadas sobre esse trabalho. Em primeiro lugar, esses autores trabalharam com fezes úmidas que, de acordo com Lorenzo Figueiras et al. (1994) são repelentes para os insetos. Além disso, o trabalho reporta uma resposta de orientação dos insetos a correntes de ar carregadas com amônia, o que não pode ser considerado como uma demonstração do papel deste composto na agregação dos insetos. Respostas à amônia podem estar associadas ao contexto de busca de hospedeiros. De fato, a amônia tem sido reportada como um sinal de orientação ao hospedeiro para alguns insetos hematófagos (Geier et al. 1999, Meijerink et al. 2001).

Estudos prévios em nosso laboratório realizaram uma caracterização das substâncias voláteis presentes nas fezes de *P.megistus*, através das técnicas de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). As substâncias voláteis majoritárias identificadas nas fezes desta espécie estão listadas na **Tabela 1**. Cinco dessas substâncias, ácidos acético, ácido hexanóico, ácido isovalérico, acetamida e 2,3-butanodiol, também foram identificadas nas fezes de *T.infestans* e *T.brasiliensis* (Lorenzo, comunicação pessoal) e estão destacadas em vermelho na **Tabela 1**.

Considerando a existência de agregação interespecífica promovida pelo sinal das fezes entre diferentes espécies de triatomíneos, inclusive entre *T.infestans* e *P.megistus* (Pires et al. 2002), esses cinco voláteis foram selecionados como prováveis componentes do feromônio de agregação das fezes destes triatomíneos. Neste projeto, avaliamos o potencial de diferentes doses destas cinco substâncias na atração de *P.megistus*. Posteriormente, desenvolvemos uma mistura destes voláteis e testamos seu potencial para promover a agregação destes insetos em abrigos.

	Compostos	Espécie		
		<i>P.megistus</i>	<i>T.infestans</i>	<i>T.brasiliensis</i>
1	3-hidroxi-2-butanona	♦	♦	-
2	ácido acético	♦	♦	♦
3	2-etil-1-hexanol	♦	♦	-
4	2,3-butanodiol	♦	♦	♦
5	propilenoglicol	-	♦	♦
6	ácido isobutírico	♦	♦	-
7	acetofenona	-	♦	-
8	ácido isovalérico	♦	♦	♦
9	acetamida	♦	♦	♦
10	ácido valérico	-	-	♦
11	ácido hexanóico	♦	♦	♦

♦ = detectado, - não detectado, detectado nas fezes das três espécies.

Tabela 1: Lista de compostos voláteis detectados nas fezes de *P.megistus*, *T.infestans* e *T.brasiliensis* através de SPME e GC-MS.

CAPÍTULO 1
OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o comportamento de *P.megistus* frente a diferentes substâncias voláteis identificadas nas suas fezes.

Objetivos Específicos

1. Testar, através de experimentos de comportamento, a relação dose-resposta de atração de *P.megistus* para as diferentes substâncias identificadas nas fezes.
2. Desenvolver uma mistura das substâncias potencialmente atrativa para *P.megistus*.
3. Testar se *P.megistus* prefere ocupar abrigos artificiais impregnados com a mistura das substâncias.

CAPÍTULO 1

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Organização e manutenção de colônias

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram provenientes de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas. As colônias de *P. megistus* foram criadas em frascos cilíndricos de acrílico com 19 cm de altura e base de 15 cm de diâmetro forrada com papel de filtro. Uma cartolina em forma de sanfona era colocada no centro dos frascos, a fim de aumentar a superfície interna. Os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e alimentados semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*).

2. Testes para avaliação da relação dose-resposta comportamental

2.1. Insetos

Para este estudo foram utilizadas ninfas de *P. megistus* de terceiro estágio em jejum de sete a dez dias pós-ecdise.

2.2. Desenho experimental

Procuramos determinar se diferentes doses das substâncias identificadas nas fezes dos insetos são capazes de atraí-los. Os ensaios correspondentes foram realizados em uma sala destinada ao estudo do comportamento destes insetos, tendo a temperatura e umidade monitorada.

Foi utilizada uma arena experimental circular de 14 cm de diâmetro com o fundo coberto por um pedaço de papel filtro a maneira de substrato (**Figura 6a**). Em lados opostos da arena foram colocados dois pedaços de papel de filtro (2 x 1 cm), um experimental, impregnado com a substância a ser testada e outro controle, limpo. Estes dois papéis foram dispostos a 1 cm da borda da arena e afastados um do outro em aproximadamente 10 cm.

Em cada ensaio um inseto era introduzido no centro da arena e permanecia preso sob um frasco por 10 minutos antes de ser liberado mediante o uso de um cordão que permitia elevar o frasco sem perturbá-lo. A escolha realizada pelo inseto era determinada após uma hora, de acordo com a localização do mesmo em uma das duas metades da arena experimental. Somente os casos em que o inseto estava imóvel no momento da observação foram considerados como respostas de

atração, já que se procurava medir respostas do tipo *arrestamento*, relacionadas com a agregação em abrigos.

As substâncias testadas isoladamente foram ácido acético, ácido isovalérico, ácido hexanóico, acetamida e 2,3-butanodiol sintéticos, da marca Aldrich (Sigma-Aldrich), todos com grau de pureza superior a 99,5%.

Para a determinação da relação dose-resposta comportamental, foram testadas diferentes concentrações de cada substância. As soluções de ácido acético, ácido isovalérico, ácido hexanóico, e 2,3-butanodiol foram preparadas utilizando diclorometano como solvente. A solução de acetamida, devido à alta polaridade do composto, foi preparada utilizando água bidestilada como solvente. Para impregnar o papel experimental com a substância na dose a ser testada foram pipetados 25 µl da solução em questão. O papel de filtro foi utilizado 30 minutos após o momento em que a solução foi pipetada, para que o solvente (diclorometano) volatilizasse. No caso da acetamida, o papel foi utilizado uma hora após pipetarmos a solução, para que a água bidestilada evaporasse e o papel estivesse completamente seco.

Nosso desenho experimental permitia a realização de quatro ensaios simultâneos (**Figura 6b**). Quatro arenas circulares eram colocadas sobre uma mesa de vidro e cobertas por uma caixa de papelão. No interior da caixa, uma divisória de papelão isolava cada ensaio experimental. A caixa possuía um orifício central na face superior que permitia a leitura dos resultados do experimento. Uma luz de baixa intensidade era acesa abaixo da mesa de vidro para permitir a visualização dos insetos por contraste. O tampo de vidro da mesa foi coberto com papel de filtro para que a iluminação vinda do lado inferior fosse difusa, evitando a influência de uma fonte luminosa no comportamento dos insetos.

2.3. Controle

Foram realizadas duas séries de ensaios controle para esse experimento. Na primeira série foram oferecidos aos insetos dois papéis de filtro limpos, a fim de testar se alguma variável não controlada poderia estar influenciando o comportamento dos insetos no nosso desenho experimental e, como consequência, gerando assimetrias no mesmo. Na segunda série experimental um papel de filtro limpo foi oferecido em um lado da arena, enquanto um papel de filtro impregnado

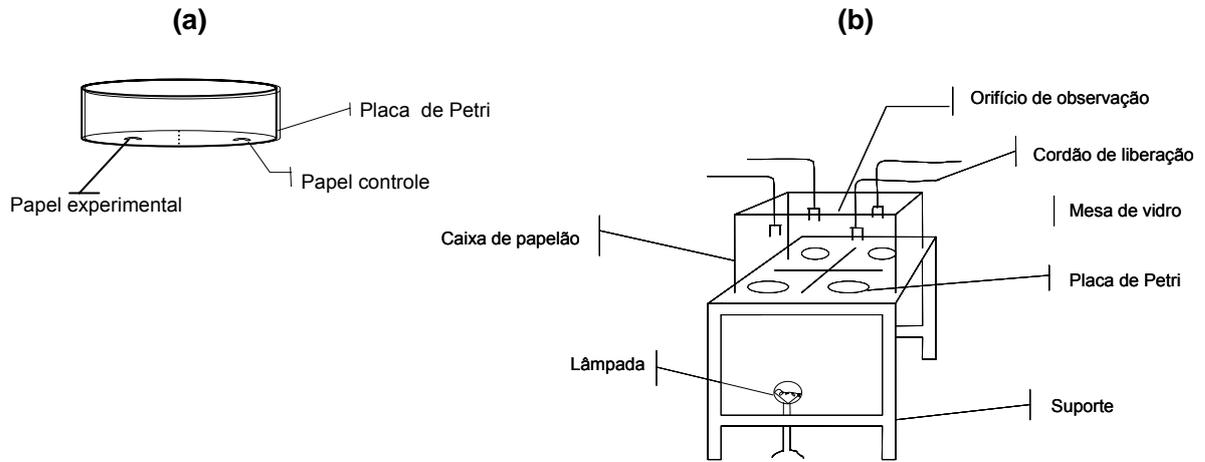


Figura 6. Desenho experimental para testar a atração dos insetos às substâncias sintéticas ou à mistura das mesmas. **(a)** detalhe da arena experimental. **(b)** desenho completo, que permite a realização de quatro ensaios simultâneos.

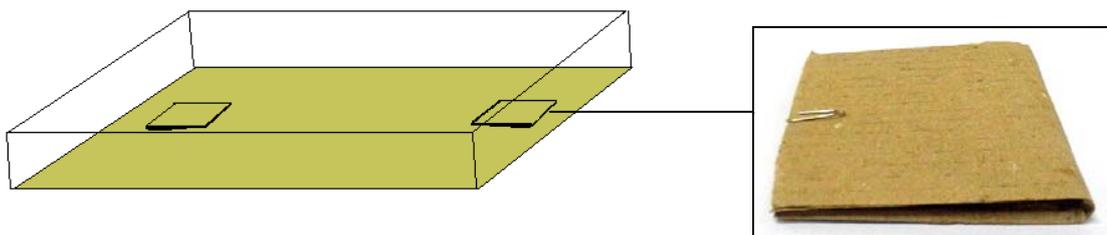


Figura 7. Desenho experimental para o estudo da agregação de grupos de triatomíneos em abrigos artificiais. À direita um detalhe do abrigo artificial feito de papelão corrugado (20 x 10 cm), dobrado ao meio de forma a gerar um abrigo de 10 cm² com duas fendas laterais de aproximadamente 0,5 cm de altura.

com diclorometano foi oferecido no outro lado, a fim de testar se o diclorometano poderia ter influência no comportamento dos insetos.

2.4. Análise Estatística

Foram realizados 32 ensaios experimentais para cada concentração de cada substância, bem como para cada série controle. A significância dos resultados foi avaliada mediante o uso do teste Binomial.

3. Desenvolvimento e teste de uma mistura das substâncias

3.1. Desenho experimental

Após a determinação das concentrações dos cinco compostos significativamente atrativos para *P.megistus*, nossos resultados foram comparados aos resultados equivalentes obtidos pelos colaboradores que testaram o comportamento de *T.infestans* e *T.brasiliensis* frente aos mesmos compostos. Além disso, nos trabalhos prévios de identificação química, foi avaliada a proporção relativa dos cinco compostos nas amostras de fezes de *P.megistus*, *T.infestans* e *T.brasiliensis* diariamente, ao longo de um período de seis dias após a sua deposição. Considerando que as fezes são atraentes até dez dias após a sua deposição e que os resultados mostraram que a proporção relativa dos cinco compostos é extremamente variável durante o período de seis dias (Lorenzo, comunicação pessoal), propomos que a proporção relativa dos compostos não seria crítica na formulação da mistura a ser testada. Dessa forma, considerando os resultados dos estudos de química e comportamento, decidimos testar uma mistura de dez nanogramas de cada composto nos bioensaios com *P.megistus*. Cabe ressaltar que nossos colaboradores realizaram os experimentos correspondentes com *T.infestans* e *T.brasiliensis*.

A resposta comportamental dos insetos frente à mistura foi testada no mesmo desenho experimental descrito anteriormente (**Figura 6**). Foram apresentadas a insetos de terceiro estágio (sete a dez dias pós-ecdise) duas opções simultâneas, um papel impregnado com a mistura de compostos e outro limpo, como controle. Para impregnar o papel experimental, pipetamos inicialmente 25 µl de uma solução de diclorometano contendo dez nanogramas de ácido acético, ácido isovalérico,

ácido hexanóico e 2,3-butanodiol. Após 15 minutos foram depositados no mesmo papel 25 µl de solução aquosa contendo dez nanogramas de acetamida. O papel experimental foi utilizado uma hora após esse procedimento.

3.2. Análise estatística

Foram realizados 32 ensaios experimentais com a mistura das cinco substâncias e a significância dos dados foi avaliada mediante o uso do teste Binomial.

4. Teste do potencial de atração de abrigos impregnados com a mistura de odores

4.1. Insetos

Foram utilizadas ninfas de *P. megistus* de quinto estágio com sete a dez dias de jejum pós-ecdise. Os insetos foram padronizados em estufas com temperatura e umidade controladas e ciclo de iluminação 12 horas luz/12 horas escuridão (12/12 LE).

4.2. Desenho experimental

Buscamos avaliar se abrigos artificiais impregnados com a mistura das substâncias eram mais atrativos para grupos de *P. megistus* do que abrigos limpos, uma vez que o sinal de agregação fecal está envolvido na marcação de abrigos (Lorenzo & Lazzari 1996).

Foram utilizadas arenas experimentais de vidro de 1 x 1 m cobertas com papel Kraft a maneira de substrato. No interior das arenas dois abrigos artificiais foram posicionados em lados opostos (**Figura 7**). O abrigo artificial consiste em um pedaço de papelão corrugado de 20 x 10 cm, dobrado ao meio de forma a gerar um abrigo de 10 cm² com duas fendas laterais de aproximadamente 0,5 cm de altura (Lorenzo & Lazzari 1996). Esse abrigo é atrativo para triatomíneos, visto que esses insetos possuem marcante tigmotaxia positiva e fototaxia negativa.

No desenho experimental, um dos abrigos apresentava em seu interior um pedaço de papel de filtro (4 x 6 cm) impregnado com a mistura de substâncias,

enquanto o outro abrigo apresentava um papel de filtro limpo, como controle. Foram realizadas três séries experimentais para testar três diferentes doses da mistura de compostos no interior do abrigo experimental: a) 16 ng de cada composto, b) 160 ng de cada composto e c) 1.6 µg de cada composto. Para impregnar o papel de filtro foi pipetada inicialmente uma solução da concentração desejada que continha uma mistura quaternária de ácido acético, ácido isovalérico, ácido hexanóico e 2,3-butanodiol em diclorometano. Após 30 minutos, uma solução aquosa foi então pipetada contendo acetamida na concentração a ser testada. O papel experimental foi utilizado uma hora após esse procedimento, sendo posicionado no centro do interior do abrigo experimental.

A arena experimental foi colocada no interior de uma sala com temperatura e umidade monitoradas e sob ciclo de iluminação 12/12 LE controlado por um temporizador. Um grupo de 30 insetos foi introduzido no centro da arena, permanecendo preso sob um frasco por 10 minutos antes de ser liberado mediante o uso de um cordão que permitia elevar o frasco sem perturbação.

A liberação dos insetos era realizada duas horas antes do início da escotofase. Após um período de 12 horas de escuridão e duas horas de iluminação, os abrigos foram cuidadosamente removidos da arena e foi determinado o número de insetos em cada um dos abrigos, experimental e controle.

4.3. Análise estatística

Foram realizados oito ou dez ensaios por série experimental para testar cada dose dos compostos (16 ng, 160 ng ou 1.6 µg de cada composto). Após cálculo das médias de insetos no interior dos abrigos experimental e controle, a significância dos resultados foi analisada utilizando-se o teste t para amostras pareadas.

CAPÍTULO 1

RESULTADOS

1. Testes para avaliação da relação dose-resposta comportamental

Todas as substâncias testadas mostraram-se capazes de modificar o comportamento de *P.megistus*, como pode ser visto nas **Figuras 8, 9, 10, 11 e 12**.

O **ácido acético (Figura 8)** apresentou uma curva dose-resposta do tipo bimodal. Segundo teste Binomial, houve resposta de atração significativa na concentração de 10 µg ($P = 0,004$) e 100 µg ($P = 0,008$) de ácido acético.

O **ácido isovalérico (Figura 9)** mostrou-se significativamente atraente na concentração de 100 ng ($P = 0,01$).

O **ácido hexanóico (Figura 10)** apresentou curva dose-resposta do tipo bimodal, sendo significativamente atraente nas concentrações de 1 ng ($P = 0,03$), 10 µg ($P = 0,01$) e 100 µg ($P = 0,03$).

A **acetamida (Figura 11)** mostrou-se significativamente atraente em altas concentrações como 10 µg ($P = 0,01$) e 100 µg ($P = 0,03$).

Para o **2,3 butanodiol (Figura 12)** observou-se uma resposta de rejeição na concentração de 10 µg ($P = 0,01$).

2. Teste da mistura de substâncias sintéticas

A mistura contendo 10 nanogramas das cinco substâncias mostrou-se significativamente atrativa ($P = 0,01$).

3. Teste do potencial de atração de abrigos impregnados com a mistura

Tanto abrigos impregnados com 1.6 µg ($P = 0,001$, $gl = 7$), quanto abrigos impregnados com 160 ng de cada substância ($P = 0,0001$, $gl = 9$) mostraram-se significativamente atrativos para ninfas de *P.megistus* (**Tabela 2**). Já abrigos impregnados com 16 ng de cada substância ($P = 0,141$, $gl = 7$) não se mostraram significativamente atrativos (**Tabela 2**).

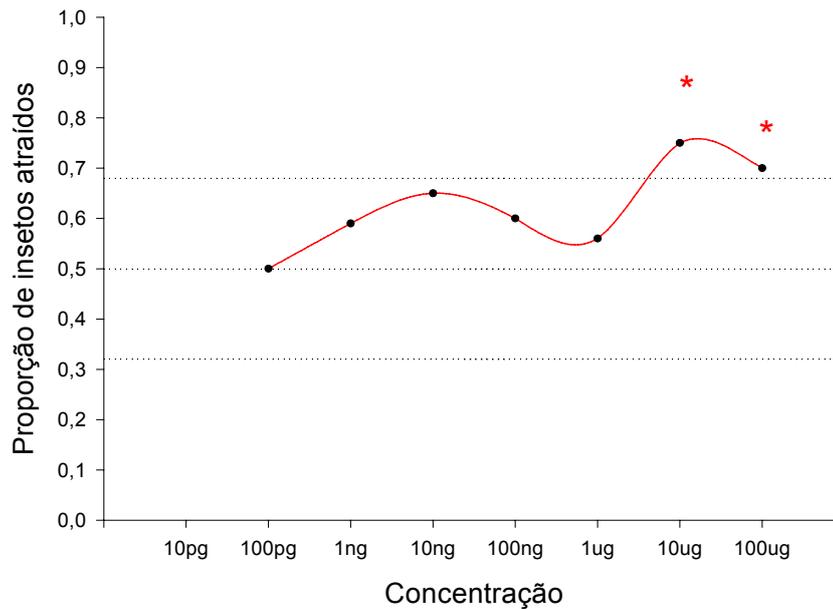


Figura 8. Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de ácido acético foram testadas no comportamento de *P.megistus*. Valores acima da linha pontilhada superior indicam reposta de atração significativa e valores abaixo da linha pontilhada inferior indicam repelência significativa. Análise por teste Binomial.

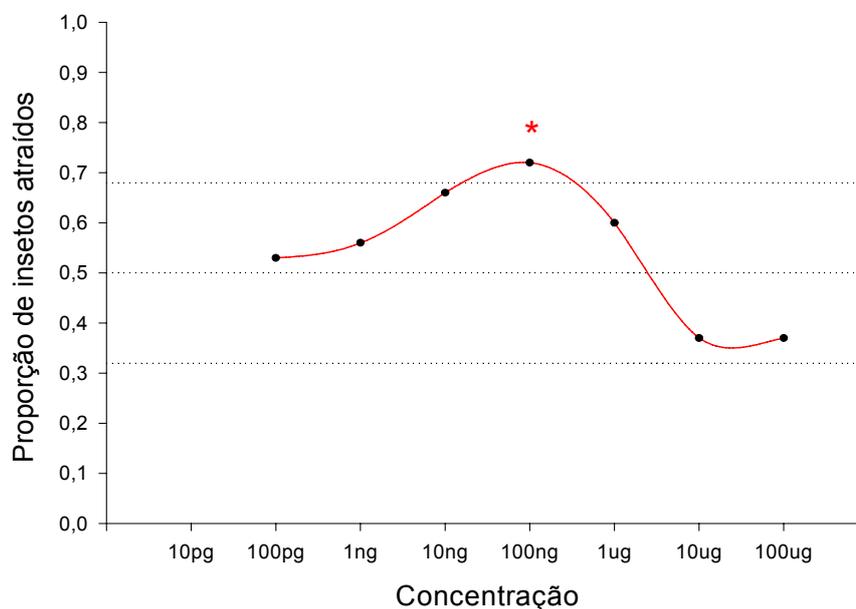


Figura 9. Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de ácido isovalérico foram testadas no comportamento de *P.megistus*. Valores acima da linha pontilhada superior indicam reposta de atração significativa e valores abaixo da linha pontilhada inferior indicam repelência significativa. Análise por teste Binomial.

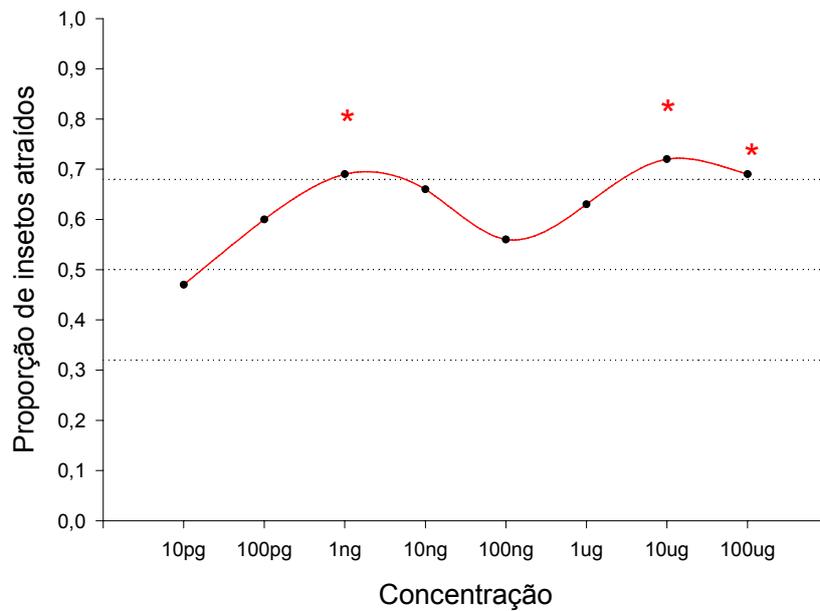


Figura 10. Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de ácido hexanóico foram testadas no comportamento de *P.megistus*. Valores acima da linha pontilhada superior indicam reposta de atração significativa e valores abaixo da linha pontilhada inferior indicam repelência significativa. Análise por teste Binomial.

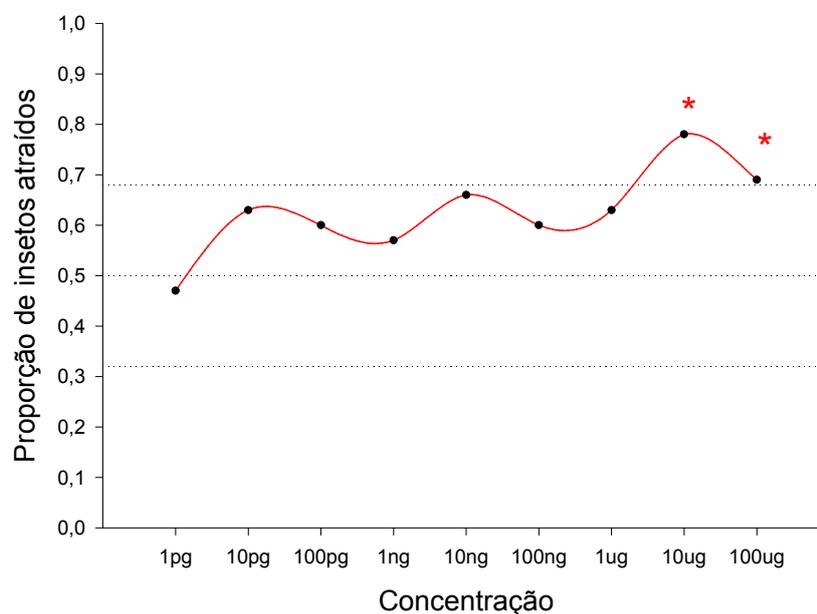


Figura 11. Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de acetamida foram testadas no comportamento de *P.megistus*. Valores acima da linha pontilhada superior indicam reposta de atração significativa e valores abaixo da linha pontilhada inferior indicam repelência significativa. Análise por teste Binomial.

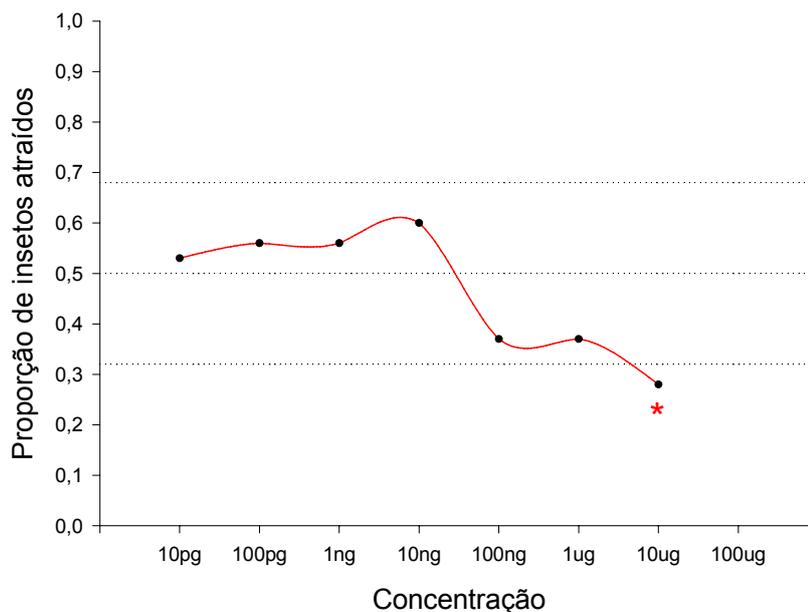


Figura 12. Proporção de insetos atraídos quando diferentes concentrações de 2,3-butanodiol foram testadas no comportamento de *P.megistus*. Valores acima da linha pontilhada superior indicam reposta de atração significativa e valores abaixo da linha pontilhada inferior indicam repulência significativa. Análise por teste Binomial.

Quantidade	16ng	160 ng	1.6 µg
Média Experimental/Controle (Total)	14,5 / 12,5 (30)	14,0 / 9,0 (30)	19,5 / 8,5 (30)
Valor de P	P=0.141	P = 0.0001	P = 0.001
Graus de liberdade	7 (8)	9 (10)	7 (8)

Tabela 2: Média de insetos no abrigo experimental e no abrigo controle quando a mistura de 16 ng, 160 ng e 1.6 µg de cada composto foram apresentados no abrigo experimental. Valor de P obtido após teste t para amostras pareadas. Os graus de liberdade são dependentes do número de ensaios realizados, indicado entre parênteses.

CAPÍTULO 1

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora vários autores tenham estudado a agregação mediada pelas fezes em triatomíneos (Schofield & Patterson 1977, Ondarza et al. 1986, Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras et al. 1994, Lorenzo & Lazzari 1996, Reisenman 2000, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002b, Vitta et al. 2002, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2005, submetido), a natureza química deste sinal é incerta até o presente momento. Alguns trabalhos buscaram, através de diferentes técnicas, a identificação química dos compostos voláteis presentes nas fezes de triatomíneos. Entretanto, nenhum desses trabalhos conseguiu demonstrar que os compostos identificados estariam realmente envolvidos no contexto de agregação. Cruz-López & Morgan (1995) obtiveram extratos das fezes de *T.infestans* e *T.mazzoti* em hexano, acetona, metanol e água. Através da análise desses extratos mediante cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM), esses autores identificaram *o*-aminoacetofenona, 4-metilquinazolina, 2,4-dimetilquinazolina e 2-pirrolidinona como as quatro substâncias majoritárias nas fezes dessas duas espécies de triatomíneos. Entretanto, nenhuma dessas substâncias ou misturas das mesmas foi capaz de promover respostas de atração nos insetos em concentrações de 0.1 a 100 ng.

Posteriormente, Taneja & Guerin (1997) sugeriram que as fezes de triatomíneos emitem amônia (NH₃) e que tal substância representaria um infoquímico utilizado na marcação de abrigos. Esses autores mostraram que papéis de filtro úmidos impregnados com fezes de triatomíneos liberam amônia e que este composto é capaz de atrair *T.infestans*. Foi demonstrado que a amônia é capaz de promover orientação dos insetos a correntes de ar que apresentam a substância e ainda de gerar repostas eletrofisiológicas nas antenas. Apesar disso, a resposta dos insetos à amônia não pode ser considerada uma demonstração de que este composto tenha um papel como promotor da agregação dos insetos em abrigos. Respostas de atração à amônia poderiam estar associadas ao contexto de busca por hospedeiros, como tem sido demonstrado para outros insetos hematófagos (Geier et al. 1999, Meijerink et al. 2001).

Em busca de esclarecer a natureza química dos sinais de agregação das fezes de diferentes espécies de triatomíneos, nosso grupo de pesquisa realizou um projeto, juntamente com outros colaboradores, para identificar as substâncias voláteis presentes nas fezes de três espécies de triatomíneos com notável relevância epidemiológica. As espécies escolhidas para esse projeto foram *T.infestans*, *T.brasiliensis* e *P.megistus*, sendo a última delas objeto dos estudos aqui apresentados. A aparente baixa especificidade do sinal de agregação,

demonstrada pelas respostas interespecíficas dos triatomíneos a esse estímulo (Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002a, 2002b, Pires et al. 2002) levou-nos a considerar o desenvolvimento de uma mistura de compostos que atuasse inespecificamente, permitindo a sua potencial utilização na atração das várias espécies.

Para capturar as substâncias das fezes, foi utilizada a técnica de micro-extração em fase sólida com uma fibra adsorvente do tipo PDMS/DVB. Dessa forma, extraíamos somente os compostos voláteis da amostra de fezes, ou seja, compostos que apresentam tensão de vapor. Além disso, essa técnica possui a vantagem de não utilizar solventes, o que evita o mascaramento de compostos muito voláteis nos cromatogramas. Essa diferença metodológica pode explicar as discordâncias entre os nossos resultados e os resultados de Cruz-López & Morgan (1995).

Em nosso projeto, as substâncias foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM) e todas as identificações foram confirmadas mediante injeção de padrões sintéticos e comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa correspondentes. Dessa forma, uma lista de compostos voláteis foi gerada a partir das amostras de fezes de cada uma das três espécies (**Tabela 1**). Optamos por procurar substâncias que fossem comuns às fezes das três espécies, considerando que existe agregação interespecífica e que, sendo assim, o sinal de agregação parece possuir composição relativamente conservada nas diferentes espécies (Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002a, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002b, Pires et al. 2002).

Dentre as cinco substâncias comuns escolhidas para os bioensaios, três jamais haviam sido identificadas nas fezes de triatomíneos (ácido isovalérico, ácido hexanóico e 2,3-butanodiol). As outras duas substâncias (ácido acético e acetamida) haviam sido identificadas por Cruz-López & Morgan (1995) em todas as amostras de fezes de *T.infestans* e *T.mazzoti*. Entretanto, esses autores não as consideraram de grande importância e dessa forma não as testaram no comportamento dos insetos.

Três das quatro substâncias identificadas nos ensaios de Cruz-López & Morgan (1995) com *T.infestans* e *T.mazzoti* (4-metilquinazolina, 2,4-dimetilquinazolina e 2-pirrolidinona) não foram identificadas em nossas amostras de fezes, provavelmente devido ao fato de serem substâncias pouco voláteis. A *o*-aminoacetofenona, foi indenticada nas fezes de *T.infestans* (**Tabela 1**).

Entre as substâncias testadas no nosso estudo com *P.megistus*, houve resposta de atração significativa nas doses de 10 µg e 100 µg de ácido acético, 100

ng de ácido isovalérico, 1 ng, 10 µg e 100 µg de ácido hexanóico e ainda em 100 µg e 10 µg de acetamida. Como pode ser visto nas **Figuras 8, 10 e 11** e ainda nos resultados obtidos para as outras espécies (Lorenzo, comunicação pessoal), algumas substâncias desencadearam respostas significativas de atração em doses elevadas, sendo o caso do ácido acético, ácido hexanóico e acetamida para *P.megistus*. Apesar disso, não consideramos essas doses para nossos estudos de agregação, uma vez que os picos dos cromatogramas obtidos por CG-EM em nosso laboratório, sugerem-nos que estes compostos estão presentes nas fezes em concentrações bem menores. De qualquer forma, não descartamos a possibilidade de utilizar essas doses posteriormente, mesmo que não pareçam estar envolvidas no contexto do sinal químico de agregação das fezes. É necessário mencionar que algumas destas substâncias, por exemplo, o ácido hexanóico (**Figura 10**), estão também presentes nos odores emitidos por diversos hospedeiros (Murphy et al. 2001, Knols et al. 1997) e, portanto, é possível que o padrão bimodal de atração observado para algumas substâncias possa ser devido à sua função em diferentes contextos comportamentais.

Embora *P.megistus* não tenha sido significativamente atraído por nenhuma dose de 2,3-butanediol (**Figura 12**), *T.infestans* e *T.brasiliensis* foram atraídos por 10 ng e 100 ng respectivamente (Lorenzo, comunicação pessoal). O 2,3-butanediol desencadeou uma resposta de repelência significativa em *P.megistus* na dose de 10 µg (**Figura 12**). Essa mesma resposta a altas doses desse composto foi observada pelos colaboradores com *T.infestans* e *T.brasiliensis*. Mais uma vez estamos diante de um padrão de comportamento no qual a concentração do composto define diferentes tipos de respostas, provavelmente relacionadas a diferentes contextos.

No caso do 2,3-butanediol devemos ressaltar que esse composto é quiral e que possui três diferentes isômeros. Em nossos experimentos trabalhamos com uma mistura racêmica. Cada isômero isolado poderia provocar um tipo de resposta ou algum deles poderia inibir a resposta ao isômero ativo. Um poderia ser mais atrativo que outro ou mesmo um poderia ser repelente e outro atrativo. A diferença de resposta comportamental a diferentes isômeros de determinado infoquímico já foi demonstrada para várias espécies de insetos, muitas vezes somente um isômero específico é constituinte do feromônio em estudo (El-Sayed et al. 2000, Park et al. 2002, Gemeno et al. 2003, Priyantha et al. 2004). Estudos já estão sendo desenvolvidos no nosso laboratório a fim de analisar as respostas comportamentais dos insetos às diferentes doses de cada um dos isômeros de 2,3-butanediol. Para

isso está sendo utilizado o mesmo desenho experimental desenvolvido nesse projeto (**Figura 6**).

Comparando os resultados aqui apresentados para *P.megistus* com os resultados obtidos para *T.brasiliensis* e *T.infestans* (Lorenzo, comunicação pessoal), pudemos notar que as formas das curvas dose-resposta foram muito semelhantes para as três espécies, em praticamente todas as substâncias testadas. Esse fato não somente reforça nossos resultados, mas indica que as estruturas sensoriais que detectam essas substâncias provavelmente são bastante similares nos triatomíneos estudados, desencadeando respostas fisiológicas e comportamentais também semelhantes.

Vários fatores foram decisivos para a formulação de uma mistura dos cinco compostos que pudesse ser testada paralelamente no comportamento de *P.megistus*, *T.brasiliensis* e *T.infestans*. Nos trabalhos anteriores de identificação química foi avaliada diariamente a proporção relativa dos cinco compostos nas amostras de fezes de *P.megistus*, *T.infestans* e *T.brasiliensis*, ao longo de um período de 6 dias após a sua deposição. Considerando que as fezes são atraentes até 10 dias após serem eliminadas (Lorenzo Figueiras & Lazzari 2000) e que os resultados mostraram que a proporção relativa dos cinco compostos é extremamente variável durante o período de seis dias (Lorenzo, comunicação pessoal), propomos que a proporção relativa dos compostos não seria crítica na formulação da mistura a ser testada. Somando esse fator à análise das respostas comportamentais de *P.megistus* frente a diferentes doses dos cinco compostos, bem como os resultados correspondentes obtidos pelos colaboradores para *T.infestans* e *T.brasiliensis*, decidimos testar uma mistura de 10 ng de cada substância. Nossos dados revelaram que a mistura formulada mostrou-se significativamente atrativa para *P.megistus*, sendo que o mesmo resultado foi obtido para as outras espécies (Lorenzo, comunicação pessoal).

Já foi demonstrado que vários insetos hematófagos que fazem uso de sinais de agregação, como triatomíneos (Schofield & Patterson 1977, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2000), mosquitos, carrapatos e mosca tsetse, não apresentam motivação para agregar imediatamente após alimentação e costumam apresentar esse comportamento mais pronunciado quando estão inativos (Wertheim et al. 2005). Sendo assim, escolhemos utilizar insetos em jejum nos nossos experimentos.

Visto que os sinais de agregação das fezes de triatomíneos parecem estar envolvidos na marcação e orientação ao abrigo (Lorenzo & Lazzari 1996,

Reisenman 2000), decidimos desenvolver um experimento que simulasse esse contexto. Nosso desenho experimental (**Figura 7**) utilizou o mesmo tipo de abrigo artificial desenhado por Lorenzo & Lazzari (1996), através do qual esses autores descreveram o padrão de distribuição das deposições fecais em relação ao abrigo para *T.infestans*. Os abrigos artificiais associados à mistura das substâncias foram preferencialmente escolhidos por *P.megistus* em relação aos abrigos sem odor (**Tabela 2**). Esses resultados reforçam a proposição de que os sinais de agregação das fezes de triatomíneos estão envolvidos na marcação dos refúgios (Schofield & Patterson 1977, Lorenzo Figueiras et al. 1994, Lorenzo & Lazzari 1996).

Abrigos impregnados com 16 ng de cada composto não se mostraram mais atrativos que abrigos limpos (**Tabela 2**), de forma que essa quantidade de odor no abrigo não parece ter sido suficiente nas nossas condições experimentais para indicar aos insetos que aquele refúgio estaria “marcado”. Esse resultado revela que se faz necessária uma quantidade determinada de odores na marcação do abrigo. Isto é reforçado ao compararmos esse resultado com aqueles observados quando impregnamos os abrigos com 160 ng ou 1,6 µg de cada composto, nos quais os insetos se agregam significativamente mais do que em abrigos limpos (**Tabela 2**). Provavelmente, através da quantidade de odor, os triatomíneos consigam discriminar entre qualquer ambiente onde há uma deposição fecal e potenciais abrigos, onde a concentração de deposições fecais seria maior.

Este trabalho é o primeiro a identificar substâncias nas fezes de triatomíneos que sejam capazes de modificar o comportamento dos insetos no contexto natural de agregação em abrigos. Dessa forma, acreditamos que a mistura de odores por nós desenvolvida poderia ser utilizada como isca para dispositivos de detecção, baseados no comportamento de agregação em abrigos destes insetos. Para vários outros insetos praga, iscas químicas baseadas em feromônios ou odores de hospedeiros têm sido utilizadas como ferramentas de detecção e controle, geralmente representando uma solução efetiva e vantajosa quanto à relação custo/benefício e a uma menor agressão ao meio ambiente (Foil & Hogsette 1994, Vale et al. 1988, Rajendran 1999).

Observamos que os resultados obtidos para *P.megistus* são muito semelhantes àqueles obtidos pelos colaboradores trabalhando com *T.infestans* e *T.brasiliensis*. Este fato é extremamente coerente com a baixa especificidade dos sinais de agregação das fezes de triatomíneos (Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002a, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2002b, Pires et al. 2002).

Sendo assim, acreditamos que seria possível desenvolvermos uma isca química que pudesse ser utilizada na detecção de diferentes espécies de triatomíneos, o que seria não somente prático, mas muito útil em regiões onde ocorra mais de uma espécie com capacidade de domiciliação.

Embora não tenham sido alvo deste estudo, os compostos químicos presentes na cutícula dos triatomíneos (*footprints*) também são candidatos para o desenvolvimento de iscas químicas, inclusive complementares, uma vez que estão envolvidos em uma fase subsequente do comportamento de agregação (Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2002). Além disso, assim como os sinais químicos das fezes, estes sinais cuticulares promovem agregação cruzada entre algumas espécies (Pires et al. 2002). No caso de *P.megistus*, Pires et al. (2002) demonstraram que a resposta de atração aos *footprints* é mais intensa que aquela observada para as fezes, sugerindo que os compostos da cutícula poderiam ter grande utilidade como iscas químicas que promovam a imobilização dos insetos no interior de sensores ou armadilhas para o controle desta espécie. Até o presente momento não foram identificadas substâncias cuticulares capazes de promover agregação entre os insetos, logo este ainda é um campo em aberto no estudo da ecologia química de triatomíneos.

No que se refere ao uso de sinais químicos no contexto de agregação, os triatomíneos revelam possuir uma incrível convergência evolutiva com *Blattella germanica* (Orthoptera, Blattellidae). Vários trabalhos demonstraram que *B.germanica* excreta juntamente com suas fezes um feromônio de agregação (Ishii & Kuwahara 1967, Ritter & Persoons 1975, Sakuma & Fukami 1993, Stejskal 1997, Jeanson et al. 2004). O uso do sinal de agregação das fezes em *B.germanica* está relacionado à marcação dos abrigos e agregação dos insetos no interior dos mesmos (Denzer 1988, Sakuma & Fukami 1990, 1993, Stejskal 1997). Stejskal (1997) demonstrou que *B.germanica* possui um padrão de distribuição das deposições fecais em relação ao refúgio, de forma que as deposições fecais são acumuladas no interior e acessos do mesmo. Papéis de filtro que permanecem em contato com indivíduos da espécie são atrativos para *B.germanica*, indicando a presença de um sinal químico na cutícula destes insetos (Ross et al. 1986, Jurenka et al. 1989, Rivault & Cloarec 1998, Samuka & Fukami 1991).

Outro exemplo de paralelismo com o sinal das fezes de triatomíneos pode ser identificado em *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae). As fezes de *S.gregaria* também possuem sinais químicos que medeiam a agregação destes insetos em

locais específicos (Obeng-Ofori et al. 1994, Torto et al. 1996). Misturas sintéticas dos voláteis identificados nas fezes desencadearam respostas de agregação similares às observadas naturalmente em *S.gregaria* (Obeng-Ofori et al. 1994). Em hematófagos, além dos triatomíneos, já foi demonstrada agregação mediada por sinais químicos presentes nas fezes em carrapatos argasídeos (Ixodoidea: Argasidae) (Leahy et al. 1973, Grenacher et al. 2001). Grenacher et al. (2001) demonstraram que substâncias sintéticas identificadas nas fezes de *Ixodes ricinus*, bem como misturas dessas substâncias, foram capazes de desencadear respostas de arrestamento nos insetos e ainda respostas eletrofisiológicas em sensílias específicas no primeiro tarso das patas.

O uso de sinais de agregação liberados nas fezes não parece ocorrer por simples coincidência em diferentes grupos de artrópodes. A presença de fezes pode ser diretamente relacionada à presença de fonte alimentar, dessa forma, agregar-se em locais onde há acúmulo de fezes garante aos indivíduos a disponibilidade de alimento (Weiss, 2006). Vários insetos dependem de microorganismos simbiotes para sua sobrevivência e muitas vezes esses simbiotes são adquiridos a partir das fezes. Em *R.prolixus* foi demonstrado comportamento de coprofagia, sendo que ninfas recém eclodidas sugam ativamente as fezes recém depositadas por outros indivíduos da espécie (Baines 1956). Através desse comportamento, essas ninfas adquirem microorganismos simbiotes essenciais para a espécie, sem o qual morreriam após certo tempo (Baines 1956). A busca por fezes exige sem dúvida mecanismos sensoriais para sua detecção e provavelmente substâncias voláteis presentes nas fezes sejam importantes pistas utilizadas nesse contexto. Considerando os fatores expostos, o uso de sinais químicos das fezes para mediar agregação em refúgios poderia ser um comportamento que teve sua origem na busca por fontes de alimentação e/ou simbiotes. Em muitos casos entre os insetos, o comportamento de agregação é mediado por sinais químicos que originalmente não possuíam função adaptativa, como produtos originados de processos metabólicos (Wertheim et al. 2005).

O uso de feromônios de agregação já foi reportado em mais de 300 artrópodes não sociais, pertencentes a 51 famílias em 12 diferentes ordens (Wertheim et al. 2005). Apesar da enorme diversidade de mecanismos de agregação em insetos, várias similaridades são encontradas no contexto ecológico em que estes sinais são utilizados (Wertheim et al. 2005). Os principais benefícios da agregação mediada por sinais químicos podem ser sumarizados em quatro

aspectos: aumento da eficiência na exploração de recursos (e.g. hospedeiro), encontro de parceiros para acasalamento, proteção contra inimigos naturais e proteção contra fatores ambientais (e.g. temperatura e umidade) (Wertheim et al. 2005). Esses aspectos são extremamente coincidentes com as necessidades básicas que uma colônia de triatomíneos precisam para proliferar com eficiência.

Capítulo 2:
Existem interações de agregação ou repelência
entre *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*
no interior de abrigos?

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO

O uso de abrigos pelos triatomíneos

Durante as horas de luz do ciclo diário, os triatomíneos podem ser encontrados agregados em abrigos protegidos. O ritmo circadiano da atividade espontânea de *T.infestans* apresenta um padrão bimodal e é separado em dois principais componentes endogenamente controlados, um pico de atividade no entardecer e um segundo no alvorecer (Lazzari 1992). Lorenzo & Lazzari (1998) estudaram a dinâmica de movimentos dentro e fora de abrigos artificiais e concluíram que os insetos são motivados a procurar por alimento no entardecer e por abrigos no alvorecer. A fototaxia negativa promove a procura de abrigos e evita a exposição a predadores (Reisenman et al. 1998). Reisenman et al. (1998) demonstraram que a resposta fototática de *T.infestans* aumenta quanto maior for a intensidade da iluminação. Além disso, a sensibilidade dessa resposta fototática varia de acordo com a hora do dia, sendo que a sensibilidade máxima ocorre na escotofase, ou seja, quando os insetos estão ativos e, dessa forma, expostos (Lazzari 1992). Esse aumento da sensibilidade da resposta fototática durante a escotofase aumenta a capacidade dos insetos de evitar ambientes iluminados nos quais os predadores poderiam facilmente detectá-los (Reisenman et al. 1998).

A fototaxia negativa revela ser de extrema importância para os triatomíneos, sendo que sua intensidade não somente varia com a hora do dia, mas também está sob controle endógeno circadiano. Insetos mantidos por um período de tempo em completa claridade, assim como insetos mantidos em completa escuridão, sem nenhuma dica de variações periódicas no ambiente, possuem as mesmas variações na sensibilidade da resposta fototática que insetos mantidos em um ciclo de 12 horas luz e 12 horas escuridão (Reisenman et al. 1998). Isso revela que a fototaxia negativa tem uma função adaptativa relevante já que depende não somente de informações vindas do ambiente, mas está sob controle endógeno, permitindo ao organismo prever as mudanças de iluminação e se adiantar às mesmas se protegendo através da procura de abrigo (Reisenman et al. 2000). A migração de pigmentos visuais na retínula de *T.infestans* parece ser responsável, pelo menos em parte, por esse controle fisiológico da resposta fototática (Reisenman et al. 2002).

A entrada dos triatomíneos nos abrigos é promovida pela sua intensa fototaxia negativa, entretanto outros fatores também exercem influência na escolha do abrigo, como por exemplo, a umidade relativa do ambiente. *T.infestans* agrega-se preferencialmente em abrigos com umidade relativa de 20% do que em abrigos com

80 %, revelando preferência por baixas umidades no interior do abrigo (Lorenzo & Lazzari 1999).

A agregação de triatomíneos no interior dos refúgios é ainda mediada por fatores tais como a sua forte tigmotaxia positiva e o uso de sinais químicos (Lorenzo & Lazzari 1996, Lorenzo Figueiras & Lazzari 2000). Alguns sinais químicos estão fortemente envolvidos na escolha e utilização de abrigos por triatomíneos. Lorenzo & Lazzari (1996) observaram uma maior tendência de *T.infestans* a defecar nos acessos do abrigo e demonstraram preferência desta espécie por abrigos associados a fezes. Esses autores demonstraram a existência de um padrão específico de distribuição das deposições fecais em relação ao abrigo (**Figura 5**) e sugeriram que as fezes atuam como marca química que permite a orientação dos insetos até os mesmos. Em estudos realizados no nosso laboratório (Barezani, comunicação pessoal) observamos que *P.megistus* também possui um padrão específico de distribuição das marcas fecais em relação aos abrigos e que também parece utilizar as fezes como marca química do abrigo.

Como já mencionado no capítulo anterior, um segundo tipo de sinal químico promove o comportamento de agregação em *T.infestans*, *P.megistus* e *T.pseudomaculata* e possivelmente ajuda esses insetos a identificarem o abrigo (Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2002). Este fator está presente na cutícula e é transferido para o substrato através do contato físico dos insetos com o mesmo. O sinal de agregação cuticular atua como uma pegada química, e foi denominado “footprints” pelos autores prévios (Figueiras & Lazzari 1998, Pires et al. 2002, Vitta et al. 2002).

Entendendo o abrigo como um recurso que é avaliado de maneira multimodal, Reisenman et al. (2000) estudaram a interação entre os estímulos visuais e olfativos na agregação de *T.infestans* em abrigos. Esses autores demonstraram que a escolha do abrigo é modulada pela convergência entre os sinais químicos liberados pelas fezes e o tipo de luz espectral que o abrigo apresenta. Os insetos foram confrontados com abrigos associados a um estímulo visual específico (cor azul, verde ou vermelha com a mesma intensidade, ou cor preta) e um estímulo químico (presença ou ausência de fezes). Na ausência de fezes, os insetos sempre preferiram permanecer na cor preta. A luz verde foi sempre rejeitada, mesmo na presença de fezes, ou seja, os insetos parecem possuir uma fototaxia negativa mais intensa frente a esta luz. Já a luz vermelha e a luz azul, embora sejam rejeitadas na ausência de fezes, quando estão em associação com fezes são escolhidas. Isso

mostra que nesse caso o sinal químico das fezes é dominante frente à fototaxia negativa às luzes vermelha ou azul. Os insetos não somente preferem a escuridão a qualquer tipo de luz, mas respondem diferentemente aos três tipos de luz, agregando-se preferencialmente na vermelha, seguida da azul e então a verde, luz na presença da qual não se agregam.

Interpretando os resultados acima apresentados, pode-se observar que a primeira reação dos triatomíneos é de evitar a luz (fototaxia negativa). A alta sensibilidade dos triatomíneos à luz verde é coerente, uma vez que a luz refletida no ambiente terrestre durante o dia é caracterizada por um alto conteúdo de comprimento de onda verde (Ward & Finlayson 1982, Reisenman et al. 2000). Uma vez estando em ambiente iluminado, faz-se fundamental o encontro de refúgios protegidos e escuros, e é neste momento que os triatomíneos procuram os sinais químicos. Particularmente ao alvorecer, quando a intensidade da luz aumenta, os triatomíneos buscam proteção e nesse contexto as fezes atuam como marca química de orientação aos acessos dos abrigos (Lorenzo & Lazzari 1996, 1998).

Neste projeto, analisamos comparativamente em *P.megistus* e *T.infestans* alguns aspectos relacionados à escolha e uso dos abrigos. Dentre esses aspectos avaliamos qual é o efeito da densidade de insetos e da iluminação (ciclo de luz 12/12 ou escuridão) no uso do abrigo por cada espécie. Avaliamos ainda como essas espécies se distribuem nos refúgios em arenas experimentais contendo dois abrigos artificiais disponíveis.

Agregação ou repelência no interior de abrigos entre *P.megistus* e *T.infestans*?

Até a chegada de *T.infestans* no Brasil pelas correntes de migração nas décadas de 30 e 40, *P.megistus* foi certamente o principal vetor da doença de Chagas no Centro, Leste e Sudeste do Brasil. (Dias 1965, 1982, Silva et al. 1971).

A distribuição geográfica de *T.infestans* e *P.megistus* se sobrepôs por muito tempo em grande parte do Brasil, sendo que na década de 50 alguns trabalhos reportavam o encontro de insetos de ambas as espécies colonizando uma mesma habitação humana (Dias 1955). Alguns estudos, entretanto, reportavam uma aparente inexistência de colonização simultânea de habitações humanas por *T.infestans* e *P.megistus* (Pellegrino & Brener 1951). Em determinadas regiões do Brasil, como Minas Gerais (Dias 1965) e São Paulo (Silva et al. 1971), onde

T.infestans foi eliminado mediante o uso de inseticidas, notou-se que *P.megistus*, proveniente de ecótopos naturais, iniciava o processo de colonização ou re-colonização das habitações.

De acordo com Aragão (1971), *P.megistus* parece competir em desvantagem com *T.infestans*, visto que ao mesmo tempo em que as capturas de *T.infestans* caíam drasticamente nas habitações, o número de *P.megistus* capturados aumentava. O autor sugere que *T.infestans* estaria mais bem adaptado para ocupar o nicho domiciliário, de forma que quando era eliminado das habitações, *P.megistus*, proveniente de ecótopos naturais, iniciava seu processo de colonização ou re-colonização. Outros trabalhos na época também sugerem que após o esvaziamento dos nichos ecológicos artificiais ocupados por *T.infestans*, existiria uma tendência de substituição nesses nichos por espécies secundárias presentes na mesma região, como por exemplo, *T.sordida* e *P.megistus* (Forattini 1976, Forattini et al. 1977a). Este fato foi evidenciado especialmente em algumas áreas onde *T.infestans* foi eliminado mediante o uso de inseticidas (Forattini et al. 1977a, Dias 1965, Silva 1971).

T.infestans é mais eficiente que *P.megistus* em obter repastos sanguíneos em camundongos não anestesiados, provavelmente porque este poderia causar uma menor irritação no hospedeiro (Pereira et al. 1995). Essa menor irritação foi associada à presença de fatores anestésicos na saliva de *T.infestans* (Dan et al. 1999). Populações mistas de *T.infestans* e *T.sordida* desenvolvidas em arenas experimentais levam a população de *T.sordida* a decrescer até uma completa desapareção após seis meses, enquanto a população de *T.infestans* não é afetada. Esse resultado foi atribuído ao fato de *T.infestans* possuir melhor habilidade em obter repastos sanguíneos (Oscherov et al. 2004). Esses dois trabalhos sugerem que esses aspectos competitivos poderiam explicar a raridade de populações mistas nas quais *T.infestans* ocorra em simpatria com outras espécies (*P.megistus* ou *T.sordida*).

Em paralelo com a anterior hipótese, Neves & Paulini (1982) sugerem a existência de substâncias emitidas por *T.infestans*, *P.megistus* e *T.sordida*, capazes de repelir as outras duas espécies. Segundo esses autores essa repelência ou incompatibilidade pode ser causada pela presença física de barbeiros, pelo odor de uma colônia de triatomíneos ou pelo odor das fezes e urina. Em contraste com os resultados apresentados por Neves & Paulini (1982), Lorenzo Figueiras & Lazzari (1998) mostraram que os sinais de agregação presentes nas fezes secas de

T.infestans, *T.sordida* e *T.guasayana* são capazes de atuar provocando a agregação dos insetos inter e intraespecificamente. Ainda em contraste, Pires et al. (2002) demonstraram a existência de agregação inter e intraespecífica, tanto para o sinal das fezes quanto para o sinal cuticular (“footprints”), entre *T.infestans* e *P.megistus*. Portanto, ainda não está claro se há interação de agregação ou repelência entre as três espécies mencionadas.

Ainda que exista agregação cruzada entre *T.infestans* e *P.megistus* mediada por sinais químicos das fezes, resta a dúvida de se outros sinais e/ou fatores poderiam ser responsáveis por uma repelência entre essas espécies no que se refere à utilização dos abrigos. Este trabalho pretende testar se essas duas espécies se agregam juntas e randomicamente dentro de abrigos artificiais, ou se pelo contrário, a presença de uma espécie afeta a escolha do abrigo pela outra. Pretendemos finalmente, analisar a potencial relação dos aspectos por nós avaliados em cada espécie relacionados ao uso do abrigo (densidade e iluminação) com a interação observada entre *P.megistus* e *T.infestans*.

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a interação entre *P.megistus* e *T.infestans* no interior de abrigos.

Objetivos Específicos

1. Analisar comparativamente em *P.megistus* e *T.infestans* a influência da densidade de insetos na escolha e uso do abrigo.
2. Analisar comparativamente em *P.megistus* e *T.infestans* a influência da iluminação na escolha e uso do abrigo.
3. Avaliar a existência de agregação ou repelência no interior de abrigos entre *T.infestans* e *P.megistus*.
4. Avaliar se a presença prévia de uma espécie no abrigo poderia afetar a entrada da outra espécie.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Organização e manutenção de colônias

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram provenientes de colônias mantidas em nosso laboratório (Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas). As colônias de *P.megistus* e *T.infestans* foram criadas em frascos de acrílico com 19 cm de altura e base de 15 cm de diâmetro forrada com papel de filtro. Uma cartolina em forma de sanfona era colocada no centro dos frascos, a fim de aumentar a superfície interna. Os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e alimentados semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*).

2. Insetos

Foram utilizadas em todas as séries experimentais ninfas de quinto estágio de *P.megistus* e *T.infestans* com um jejum de sete a dez dias pós-ecdise. Os insetos foram padronizados em estufas com temperatura e umidade controladas e mantidos sob um ciclo de iluminação 12/12 LE.

3. Efeito da densidade de insetos e da iluminação do ambiente sobre o uso de abrigos

3.1. O efeito da densidade de insetos

3.1.1. Desenho experimental

Testamos nesta série experimental se a densidade de insetos poderia afetar o uso dos abrigos pelas duas espécies. O parâmetro analisado foi o número de insetos que permaneceu dentro e fora do abrigo quando 20, 40, 60, 80 ou 100 insetos foram liberados na arena. Foram utilizadas arenas de vidro de 1 x 1 m, cujo substrato foi recoberto com papel Kraft. No centro das arenas foi oferecido um abrigo artificial idêntico ao descrito no Capítulo 1 (**Figura 7**). As arenas foram mantidas em uma sala com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e um regime artificial de iluminação (12/12 LE) controlado por um temporizador. O grupo de insetos foi liberado no centro da arena duas horas antes do início da fase escura. No quarto dia de experimento o

abrigo foi removido da arena duas horas após o início da fase clara e o número de insetos dentro e fora do abrigo foi determinado.

3.1.2. Análise Estatística

Três ensaios foram realizados para cada densidade de insetos testada (20, 40, 60, 80 e 100 indivíduos), para cada espécie (*P.megistus* e *T.infestans*). A proporção média de insetos fora do abrigo para cada densidade testada (20, 40, 60, 80 e 100 insetos) e para cada espécie foi analisada mediante uma ANOVA de dois fatores (densidade e espécie). Tanto para *T.infestans*, quanto para *P.megistus*, foi comparada a proporção média de insetos fora do abrigo em cada densidade através de ANOVA de fator único. Todas as análises de variância foram seguidas de comparações múltiplas de Tukey. Finalmente, a proporção média de *P.megistus* fora do abrigo foi comparada à proporção média de *T.infestans* fora do abrigo em cada densidade testada mediante teste t de student.

3.2. O efeito da iluminação

3.2.1. Desenho experimental

Para avaliarmos como a presença de um ciclo de iluminação modula o uso do abrigo em cada espécie, analisamos o número de insetos que fica fora do abrigo quando o ambiente permanece em completa escuridão. A arena de 1 x 1 m, na qual um abrigo central era oferecido aos insetos, foi mantida em uma sala escura com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Um grupo de 40 ninfas de uma das duas espécies foi liberado no centro da arena e permaneceu nesse ambiente durante três dias. Após as primeiras duas horas do quarto dia foi determinado o número de insetos que se encontravam dentro ou fora do abrigo. Os resultados foram comparados aos resultados obtidos no experimento anterior (veja 3.1), quando 40 ninfas foram liberadas sob ciclo de luz 12/12 LE.

3.2.2. Análise Estatística

Três ensaios foram realizados para cada espécie e para cada tratamento (ciclo de luz ou escuridão permanente)

Foi utilizado o teste t de Student para analisar se existia diferença significativa entre:

1. A média de insetos fora do abrigo quando *T.infestans* permanece no ciclo de luz e a média de insetos fora do abrigo quando *P.megistus* permanece no ciclo de luz.
2. A média de insetos fora do abrigo quando *T.infestans* permanece na escuridão e a média de insetos fora do abrigo quando *P.megistus* permanece na escuridão.
3. A média de insetos fora do abrigo sob ciclo de luz e a média de insetos fora do abrigo sob escuridão permanente, para cada espécie.

4. Estudo da interação em abrigos entre *T.infestans* e *P.megistus*

4.1. Agregação ou repelência interespecífica no abrigo entre *T.infestans* e *P.megistus*?

4.1.1 Desenho experimental

O fato dos sinais químicos das fezes e da cutícula promoverem respostas interespecíficas de agregação (Pires et al. 2002) não demonstra que *P.megistus* e *T.infestans* sejam capazes de permanecer juntos no interior de um mesmo abrigo. Conseqüentemente, procuramos determinar se *P.megistus* e *T.infestans* se agregam juntos no interior de abrigos, ou se existe qualquer processo de repelência na interação entre indivíduos destas espécies.

Para este estudo foram utilizadas arenas de vidro de 1 x 1 m, que apresentaram o substrato recoberto com papel Kraft e em cujo interior foram oferecidos dois abrigos artificiais (**Figura 7**). Os abrigos foram posicionados em lados opostos da arena. As arenas foram mantidas em uma sala com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um regime artificial de iluminação (12/12 LE) controlado por um temporizador.

20 ninfas de quinto estágio de cada espécie foram liberadas simultaneamente no centro da arena. Após sete dias de experimento os abrigos foram removidos da arena e o número de insetos de cada espécie dentro de cada um dos dois abrigos foi determinado. Foram realizados 12 ensaios com as duas espécies simultaneamente liberadas na arena.

4.1.2 Controles

Como controles desse experimento foram desenvolvidas duas séries de ensaios, onde somente *P.megistus* ou *T.infestans* eram liberados na arena (**Figura 7**). Em cada ensaio foram liberadas 20 ninfas de uma das espécies, mantendo assim as mesmas condições do experimento anterior.

Após sete dias foi determinado o número de insetos em cada abrigo. O objetivo destas séries de ensaios foi comparar o padrão de distribuição que cada espécie adota quando isolada com o padrão observado quando as espécies estão em associação. Através destes experimentos visamos identificar se existe alguma influência da presença de uma espécie sobre o comportamento da outra. Foram realizados 8 ensaios com *P.megistus* e 8 ensaios com *T.infestans*.

4.2. A presença de uma espécie no abrigo afeta a entrada da outra espécie?

Nesta série experimental, avaliamos o uso de abrigos pelas duas espécies quando uma delas é liberada na arena três dias e meio antes do que a outra. Para esses ensaios utilizamos o mesmo desenho (**Figura 7**) e condições experimentais já descritos anteriormente, uma arena apresentando dois abrigos artificiais posicionados em lados opostos e mantida em uma sala com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo artificial de iluminação (12/12 LE). 20 exemplares de uma das espécies foram liberados inicialmente na arena. Às 12 horas do quarto dia, 20 indivíduos da outra espécie foram liberados na mesma arena. O ensaio continuava por mais três dias, totalizando assim sete dias. Após esse período, os abrigos foram removidos da arena e o número de insetos de cada espécie dentro de cada um dos dois abrigos foi determinado. Nessas condições, a primeira espécie liberada tinha a oportunidade de ocupar os dois abrigos da maneira que o faria isoladamente,

enquanto que a segunda espécie encontrava esses abrigos ocupados pela outra espécie. Foram realizadas duas séries experimentais com 8 ensaios cada uma. Na primeira série, *P.megistus* foi a espécie liberada previamente na arena e na segunda série, *T.infestans* foi a espécie liberada inicialmente na arena.

4.3. Análise do padrão de distribuição de cada espécie nas diferentes séries experimentais.

4.3.1. Avaliação da distribuição em abrigos nas diferentes séries experimentais.

Para cada espécie (*T.infestans* ou *P.megistus*) foram considerados quatro diferentes tratamentos: isolada na arena (veja 4.1.2); liberada na arena simultaneamente com a outra espécie (veja 4.1.1); liberada na arena antes da outra espécie (veja 4.2) e liberada na arena depois da outra espécie (veja 4.2). A distribuição nos dois abrigos da arena experimental foi considerada para análise estatística como o módulo da diferença do número de insetos entre os dois abrigos, ou seja, a diferença absoluta entre o número de insetos no abrigo 1 e o número de insetos no abrigo 2. Para *T.infestans*, a média desse valor foi analisada em cada um dos quatro tratamentos mediante ANOVA. Para *P.megistus*, cujos valores obtidos não atendiam às suposições para ANOVA, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis nesta análise. Foram realizadas comparações múltiplas de Tukey ou de Dunn nos casos de Anova ou teste de Kruskal-Wallis, respectivamente.

4.4.2 Avaliação do número de insetos fora dos abrigos nas diferentes séries experimentais.

Para cada espécie (*T.infestans* ou *P.megistus*) foram considerados os mesmos quatro tratamentos anteriormente citados. A média de insetos fora dos abrigos foi analisada em cada um dos quatro tratamentos mediante teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas de Dunn.

4.4.3. Avaliação da distribuição de cada espécie nos abrigos quando co-habitam na arena.

A distribuição de *T.infestans* nos abrigos foi comparada à distribuição de *P.megistus* nos abrigos para cada tratamento no qual as espécies co-habitaram na arena: quando liberadas simultaneamente (veja 4.1.1); quando *T.infestans* era liberado previamente (veja 4.2); quando *P.megistus* era liberado previamente (veja 4.2). A distribuição nos dois abrigos da arena experimental foi considerada para análise estatística como o módulo da diferença de número de insetos entre os abrigos 1 e 2. A média desse valor foi comparada entre as duas espécies mediante teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, nos casos em que os valores não atendiam às suposições para teste t de Student.

CAPÍTULO 2

RESULTADOS

1. Efeito da densidade de insetos e da iluminação do ambiente sobre o uso de abrigos

1.1. O efeito da densidade de insetos

A **Figura 13** mostra a proporção média de insetos que permaneceram fora dos abrigos quando diferentes densidades de insetos (20, 40, 60, 80 ou 100) foram testadas.

Os dados demonstram que *P.megistus* possui uma tendência maior a permanecer fora dos abrigos quando comparado a *T.infestans* (**Figura 13**). Vemos que para *P.megistus*, mesmo frente a baixas densidades, cerca de 9% dos insetos permaneceu fora dos abrigos (**Figura 13**). Em qualquer densidade testada, a proporção de insetos fora dos abrigos é significativamente maior para *P.megistus* (t de Student, $P < 0,001$).

A densidade de insetos afetou significativamente a proporção de indivíduos que permaneceu fora dos abrigos tanto para *T.infestans* (ANOVA, $P < 0,001$), quanto para *P.megistus* (Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). Quando analisamos a proporção de insetos que permaneceram fora do abrigo em função da densidade, podemos observar que *T.infestans* (**Figura 13**) sofreu um efeito significativo somente no salto entre 80 e 100 insetos (Tukey, $P < 0,001$). Já *P.megistus* (**Figura 13**) mostra significativa diferença da proporção de insetos fora do abrigo entre a série com 40 insetos e a série com 80 insetos (Dunn, $P < 0,01$) e ainda entre a série com 80 e a série com 100 insetos (Dunn, $P < 0,001$). Logo, o efeito da densidade é significativamente diferente nas duas espécies (ANOVA, $P < 0,001$), sendo maior em *P.megistus*.

1.2. O efeito da iluminação

A **Figura 14** mostra a proporção de insetos fora dos abrigos quando *T.infestans* ou *P.megistus*, permaneceram sob ciclo de luz ou sob escuridão permanente.

A média de insetos observada fora dos abrigos sob ciclo de luz (**Figura 14**) foi significativamente maior em *P.megistus* do que em *T.infestans* (t de Student, $P < 0,05$).

Já sob escuridão permanente, não houve uma diferença significativa no

comportamento de *P.megistus* e *T.infestans* (**Figura 14**), embora a média de insetos fora do abrigo seja maior para *T.infestans*.

A proporção de insetos fora do abrigo sob ciclo de luz foi significativamente menor do que sob escuridão permanente tanto para *P.megistus* (t de Student, $P < 0,01$), quanto para *T.infestans* (t de Student, $P < 0,0001$) (**Figura 14**). Logo, a diferença entre a proporção de insetos fora do abrigo no ciclo de luz e na escuridão (**Figura 14**) é maior para *T.infestans*.

2. Estudo da interação em abrigos entre *T.infestans* e *P.megistus*.

2.1. Agregação ou repelência interespecífica no abrigo entre *T.infestans* e *P.megistus*?

Os resultados das series controle com as espécies separadas mostraram que a distribuição de insetos nos abrigos ocorreu ao acaso, tanto para *T.infestans* (**Figura 15a**), quanto para *P.megistus* (**Figura 16a**). Isso significa que cerca de 50% dos insetos permaneceram em cada um dos dois abrigos. Além disso, uma baixa proporção de *P.megistus*, uma média de dois insetos por ensaio, permaneceu fora dos abrigos (**Figura 16a**). Por outro lado, *T.infestans* não apresentou essa tendência, sendo que 100% dos insetos foram encontrados nos abrigos (**Figura 15a**).

Quando os insetos das duas espécies foram liberados simultaneamente e permaneceram juntos por sete dias na mesma arena, a distribuição nos dois abrigos continuou acontecendo de maneira aleatória. Podemos observar que cerca de 50% dos indivíduos de cada espécie foi encontrado em cada abrigo (**Figura 15b e 16b**). Deve ser ressaltado que sob este tratamento uma baixa porcentagem de ninfas de *P.megistus* ficaram fora dos abrigos (**Figura 16b**), enquanto nenhuma ninfa de *T.infestans* apresentou esse padrão de comportamento (**Figura 15b**).

O tempo que as diferentes espécies demoraram a entrar nos abrigos não foi quantificado neste estudo. Porém, pudemos observar que em todas as séries experimentais *T.infestans* entrou nos abrigos mais rapidamente do que *P.megistus*. Enquanto para *T.infestans* era necessário um máximo de um dia para que todos os insetos entrassem nos abrigos, para *P.megistus* dois a três dias foram necessários para que a maior parte dos insetos entrassem nos abrigos, e, como foi mencionado,

mesmo assim alguns insetos ficaram fora dos abrigos até o fim dos ensaios (**Figura 16**).

2.2. A presença de uma espécie no abrigo afeta a entrada da outra espécie?

Quando *P.megistus* (**Figura 16c**) foi liberado na arena três dias antes que *T.infestans* (**Figura 15d**), ambas as espécies se distribuíram aleatoriamente nos dois abrigos. *T.infestans*, como nos outros experimentos, manteve uma proporção praticamente nula de insetos fora dos abrigos (**Figura 15d**). Cerca de 10% dos *P.megistus* (**Figura 16c**) permaneceu fora dos abrigos, também de maneira semelhante ao observado nos outros experimentos (**Figuras 16a e b**).

Quando *T.infestans* (**Figura 15c**) foi liberado na arena três dias antes que *P.megistus* (**Figura 16d**), mais uma vez, *T.infestans* e *P.megistus* co-habitaram os abrigos. A proporção de cada uma das espécies foi similar nos dois abrigos, indicando que as espécies continuaram a se distribuir aleatoriamente (**Figura 15c e 16d**). Entretanto, um fato marcante foi que cerca de 40% das ninfas de *P.megistus* permaneceu fora dos abrigos (**Figura 16d**).

2.3. Análise do padrão de distribuição de cada espécie nas diferentes séries experimentais.

Não houve diferença significativa na distribuição dos insetos nos abrigos 1 e 2 entre os quatro diferentes tratamentos (espécie isolada na arena; liberada na arena simultaneamente com a outra espécie; liberada na arena antes da outra espécie; liberada na arena depois da outra espécie), tanto para *T.infestans* (**Figura 15**), quanto para *P.megistus* (**Figura 16**).

Para *T.infestans* (**Figura 15**), não houve diferença significativa entre as médias de insetos fora dos abrigos nos quatro diferentes tratamentos (espécie isolada na arena; liberada na arena simultaneamente com a outra espécie; liberada na arena antes da outra espécie; liberada na arena depois da outra espécie). Já *P.megistus* (**Figura 16**) mostrou uma significativa diferença na média de insetos fora dos abrigos entre a série em que foi liberado na arena posteriormente a *T.infestans* (**Figura 16d**) e as demais séries (**Figuras 16a, b e c**) (Dunn, $P < 0,0001$). Entre as

outras três séries (espécie isolada na arena; liberada na arena simultaneamente com a outra espécie; liberada na arena antes da outra espécie), *P.megistus* não apresentou diferenças significativas na média de insetos fora dos abrigos (**Figura 16 a, b e c**).

A distribuição de *T.infestans* (**Figura 15b, c e d**) e *P.megistus* (**Figura 16 b,c e d**) nos dois abrigos não teve diferença significativa em nenhuma das séries experimentais nas quais as espécies co-habitaram a arena: quando liberadas simultaneamente (**Figura 15b e 16b**); quando *P.megistus* era liberado previamente (**Figura 16c e 15d**) e quando *T.infestans* era liberado previamente (**Figura 15c e 16d**).

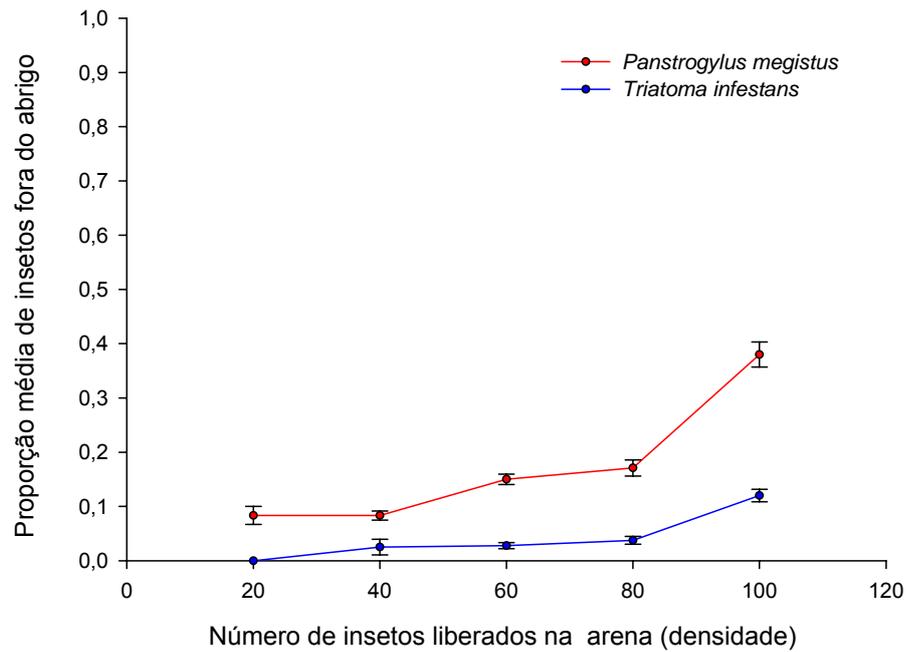


Figura 13. Proporção média de insetos fora dos abrigos quando diferentes densidades de insetos foram liberadas na arena. Os dados referentes a *P.megistus* estão representados em vermelho, enquanto os referentes a *T.infestans* estão em azul.

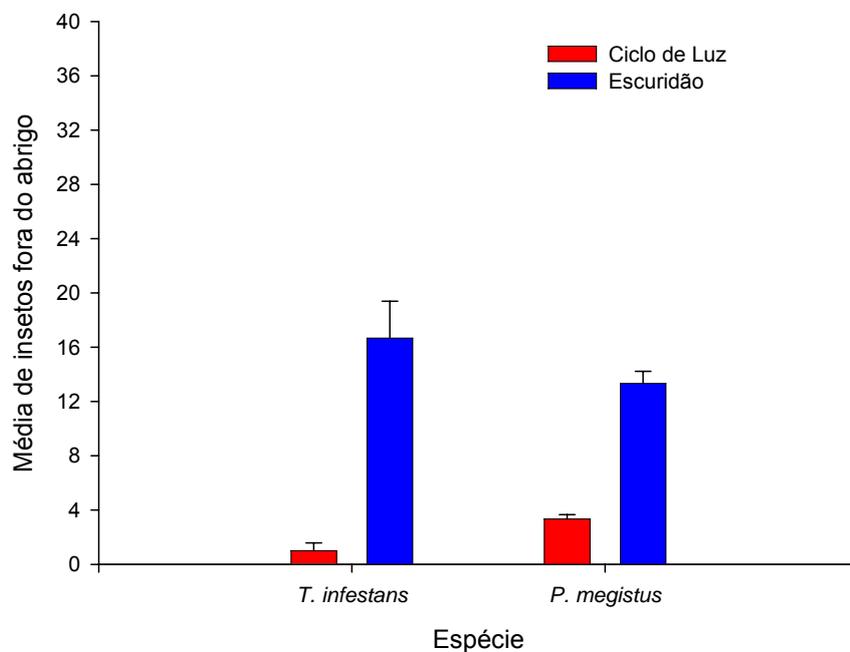


Figura 14. Média de *T.infestans* e *P.megistus* fora do abrigo sob ciclo de luz 12/12 LE (vermelho) e sob escuridão permanente (azul).

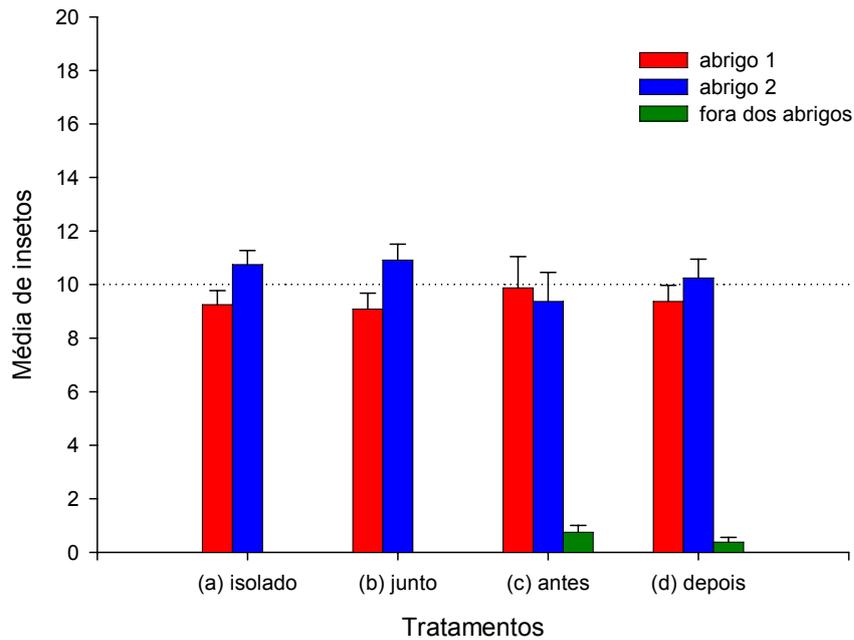


Figura 15. Média de *T. infestans megistus* no abrigo 1 (vermelho), no abrigo 2 (azul) e fora dos abrigos (verde) nos quatro diferentes tratamentos: (a) isolado na arena; (b) liberado na arena simultaneamente com a outra espécie; (c) liberado na arena antes da outra espécie e (d) liberado na arena depois da outra espécie.

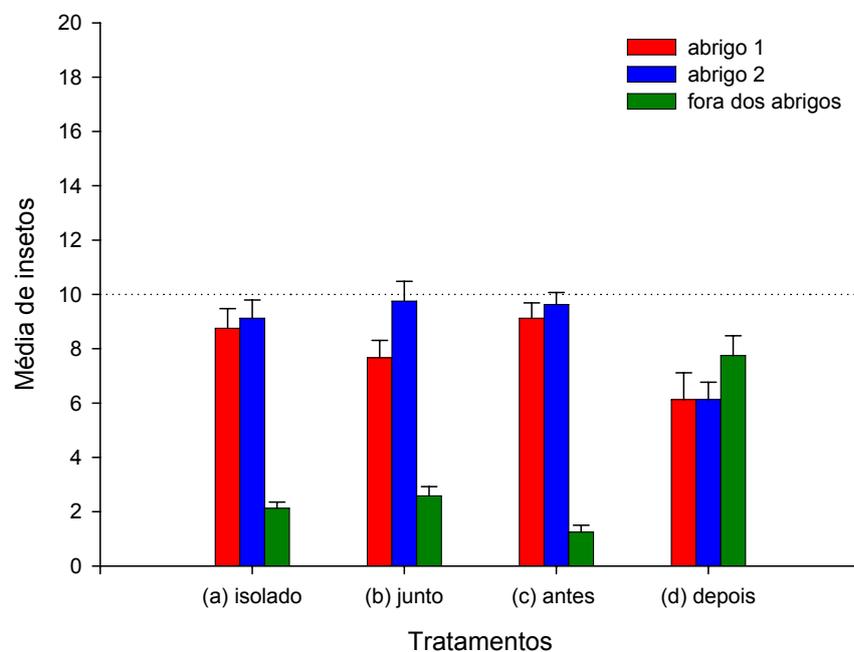


Figura 16. Média de *P. megistus* no abrigo 1 (vermelho), no abrigo 2 (azul) e fora dos abrigos (verde) nos quatro diferentes tratamentos: (a) isolado na arena; (b) liberado na arena simultaneamente com a outra espécie; (c) liberado na arena antes da outra espécie e (d) liberado na arena depois da outra espécie.

CAPÍTULO 2

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

T. infestans mostra uma maior atividade de procura de abrigos nas últimas horas antes do amanhecer (Lorenzo & Lazzari 1998). Porém, a decisão de entrar e permanecer dentro de um abrigo não é somente modulada pela variação desta motivação no ciclo diário. Marcas químicas de comunicação intra-específica estão envolvidas no uso de abrigos (Lorenzo & Lazzari 1996, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Pires et al. 2002). As características de iluminação e cor do local também afetam drasticamente a probabilidade de escolha do refúgio (Reisenman et al. 2000). Foi também demonstrado que *T. infestans* agrega-se preferencialmente em abrigos com baixa umidade relativa do que em abrigos com alta umidade relativa (Lorenzo & Lazzari 1999).

No presente estudo demonstramos que a densidade de ninfas influencia a proporção de insetos que entram e permanecem no abrigo para ambas as espécies estudadas. A comparação entre as duas espécies, revelou que *P. megistus* apresenta uma proporção de insetos fora do abrigo significativamente maior que *T. infestans* em todas as densidades testadas. Além disso, a resposta de *P. megistus* frente ao aumento da densidade de insetos foi significativamente mais pronunciada (**Figura 13**).

A proporção de ninfas de *T. infestans* que permaneceu fora dos abrigos foi nula ou extremamente baixa em praticamente todas as densidades (**Figura 13**). Somente entre as densidades de 80 e 100 insetos (**Figura 13**) a proporção de ninfas que permaneceu fora do abrigo foi significativamente maior. Dessa forma, sugerimos que *T. infestans* apenas variou seu comportamento quando atingida a capacidade de carga do abrigo. Sendo assim, o número máximo de ninfas de *T. infestans* que cabem no interior do abrigo no nosso desenho experimental aparentemente estaria entre 80 e 100 indivíduos, em uma área correspondente a 10 cm² (vide página 29).

Algumas ninfas de *P. megistus* permaneceram fora do abrigo mesmo nas mais baixas densidades (**Figura 13**). Esse padrão de comportamento parece ser uma característica particular desta espécie. Para *P. megistus*, a faixa de densidade entre 80 e 100 insetos também parece ser crítica, pois foi nela que observamos a alteração mais brusca na proporção de insetos que ficaram fora do abrigo (**Figura 13**). Esta variação está provavelmente relacionada ao mesmo fator crítico para *T. infestans*, ou seja, a quantidade máxima de insetos que cabem no interior do abrigo. Entretanto, *P. megistus* apresentou ainda uma alteração significativa de seu comportamento entre as densidades de 40 e 80 insetos (**Figura 13**). Apesar de não existir uma significativa diferença entre a proporção de insetos fora do abrigo entre

as densidades de 40 e 60 ou 60 e 80 insetos, vemos que a partir de 40 insetos a proporção de indivíduos fora do abrigo começa a aumentar e que essa diferença passa a ser significativa quando atingida a densidade de 80 insetos. Logo, *P.megistus* provavelmente sofre a influência da densidade em seu comportamento a partir de densidades menores que *T.infestans* (**Figura 13**).

A diferença observada entre as duas espécies pode ser devida a uma menor tolerância de *P.megistus* às altas densidades de insetos no abrigo. Outra possibilidade seria que para *P.megistus* o número máximo de insetos que cabem no interior do abrigo fosse menor que para *T.infestans*. Essa hipótese poderia estar relacionada tanto a uma diferença de tamanho entre as espécies, quanto a uma diferença na tigmotaxia das mesmas. No último caso, *T.infestans* possuiria uma maior tigmotaxia, logo, tenderia a se agregar mais no abrigo que *P.megistus*. O fato de uma proporção de *P.megistus* sempre ter permanecido fora dos abrigos sugere que esta espécie possui uma menor motivação para procura e entrada no abrigo. Logo, qualquer fator que torne o abrigo menos atrativo, como aumento da densidade, poderia promover a rejeição do mesmo pelo inseto.

Pereira et al. (1995) estudaram a relação entre a densidade de insetos e o aumento do peso corporal quando *P.megistus* ou *T.infestans* se alimentam em hospedeiros não anestesiados. Esses autores demonstraram que para ambas as espécies existe uma relação inversamente proporcional entre densidade de insetos e aumento de peso, de forma que quanto maior a densidade de insetos, menor o ganho de peso individual. Entretanto, essa relação foi mais intensa para *P.megistus* que para *T.infestans*, revelando que a densidade de insetos interfere de forma mais pronunciada na obtenção de respastos sanguíneos em *P.megistus* do que em *T.infestans*. Esses resultados, juntamente com nossos resultados sobre a relação entre densidade de insetos e uso do abrigo, sugerem que *P.megistus* é mais sensível que *T.infestans* a altas densidades de insetos. Dessa forma, é possível que *T.infestans* seja capaz de tolerar desenvolver-se em colônias maiores que o tamanho de colônia tolerado por *P.megistus*. Essa hipótese talvez ajudasse a compreender porque as colônias intradomiciliares de *P.megistus* não chegam a atingir a grande densidade de insetos observada nas colônias de *T.infestans*, que podem alcançar mais de 3.000 indivíduos em uma só casa (Marsden 1980).

Quando testamos o efeito da iluminação em *P.megistus* e *T.infestans*, a proporção de insetos que permaneceu fora do abrigo sob ciclo de luz foi significativamente menor do que sob escuridão permanente (**Figura 14**). Dessa

forma, a fototaxia negativa desses insetos demonstrou ter uma grande influência na motivação para a procura de abrigos.

Esse resultado já era esperado pelo menos para *T.infestans*, uma vez que a intensa fototaxia negativa dessa espécie já foi demonstrada por alguns trabalhos (Ward & Finlayson 1982, Reisenman et al. 1998, Reisenman 2000). Sob condições naturais de iluminação, *T.infestans* mostra uma resposta fototática negativa à luz branca que parece ser causada principalmente pelo espectro de luz verde (Ward & Finlayson 1982). A resposta fototática negativa de *T.infestans* aumenta quanto maior for a intensidade da luz (Reisenman 1998). Além disso, essa resposta varia de acordo com a hora do dia, sendo que na escotofase os insetos tendem a evitar mais intensamente a iluminação mais do que na fotofase (Reisenman 1998). Uma vez que essa variação da resposta fototática com a hora do dia é preservada em insetos que permanecem sob escuridão ou iluminação permanente, conclui-se que este comportamento está sob controle circadiano (Reisenman 1998). Sendo assim, a fototaxia negativa não depende somente de informações vindas do ambiente, mas está sob controle fisiológico, o que revela a importante função adaptativa desse comportamento.

Nossos resultados revelam uma aparente diferença entre a resposta fototática negativa de *P.megistus* e *T.infestans*, sugerindo que *P.megistus* poderia ter uma menor sensibilidade à iluminação. Vemos que sob ciclo de luz *P.megistus* apresenta uma quantidade significativamente maior de insetos fora do abrigo do que *T.infestans* (**Figura 14**). Já quando permanecem em completa escuridão, a proporção de insetos fora dos abrigos não variou significativamente entre as duas espécies, sugerindo que a iluminação seria o fator responsável pela diferença observada quando as espécies permanecem no ciclo de luz (**Figura 14**). A partir desses resultados, seria interessante estudar mais detalhadamente a resposta fototática de *P.megistus* para que pudesse ser realizada uma comparação mais apurada entre esta espécie e *T.infestans*.

Reisenman et al. (2002) sugerem que o controle circadiano da resposta fototática de *T.infestans* é modulado pela migração de pigmentos visuais presentes nas retínulas desses insetos. Durante a fotofase, os pigmentos se concentram em torno do rabdômio central, fazendo com que somente a luz paralela ao eixo longitudinal do omatídeo atinja essa estrutura visual. Durante a noite esses pigmentos se concentram marginalmente nas células e permitem que a luz atinja os rabdômeros periféricos, aumentando a sensibilidade à luz. Além disso, a distância

entre a córnea e o rabdoma diminui durante a noite intensificando esse processo (Reisenman et al. 2002). Possivelmente, estudar as estruturas e a fisiologia ocular de *P.megistus* permitiria explicar as diferenças entre a resposta fototática desta espécie e a de *T.infestans*.

Observamos que *P.megistus* é mais sensível ao efeito da densidade de insetos no abrigo, enquanto *T.infestans* é aparentemente mais sensível ao efeito da iluminação. Isto revela a importância de se estudar cada espécie de triatomíneo em particular, não generalizando as respostas comportamentais de uma espécie para as demais espécies desta subfamília. Por esse motivo, decidimos que antes de partirmos para a avaliação do comportamento das espécies quando co-habitam no mesmo ambiente, era necessário avaliar comparativamente alguns aspectos relacionados ao uso do abrigo em cada espécie, como a densidade e a iluminação. Somente dessa forma poderíamos ter uma idéia da influência real de uma espécie sobre o comportamento da outra no contexto de exploração de abrigos, eliminando o efeito conhecido dos outros componentes estudados.

Um aspecto essencial avaliado foi a maneira como cada espécie se distribui em arenas que apresentavam dois abrigos artificiais. Somente através do conhecimento do padrão de distribuição em abrigos de cada uma das espécies isoladamente (**Figuras 15a e 16a**), poderíamos avaliar se existiria uma mudança desse padrão quando as espécies estivessem juntas na arena experimental. Nossos experimentos revelaram que ambas as espécies, quando isoladas na arena, se distribuem aleatoriamente entre os dois abrigos, ou seja, cerca de 50% dos insetos permanecem em cada abrigo (**Figura 15a e 16a**). Através deste simples experimento demonstramos pela primeira vez esse padrão de comportamento nas espécies estudadas. Visto que triatomíneos mostram uma típica resposta de agregação (Lorenzo Figueiras et al. 1994, Figueiras & Lazzari 2000), caracterizada pela tendência dos insetos de permanecerem agrupados em locais específicos, não seria surpreendente que, mesmo na presença de dois abrigos disponíveis, os insetos se agregassem somente em um deles. Entretanto foi observado exatamente o contrário, para ambas as espécies (**Figura 15a e 16a**).

Pudemos observar que *P.megistus*, isolado na arena, apresentou aproximadamente 10% dos insetos fora dos abrigos (**Figura 16a**). Já *T.infestans* não demonstra esse comportamento, sendo que todos os insetos permaneceram no interior do abrigo (**Figura 15a**). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos no estudo do efeito da densidade sobre o uso do abrigo (**Figura 13**), bem

como no estudo do efeito da iluminação (**Figura 14**).

O objetivo central deste estudo foi esclarecer se há agregação ou repelência dentro de abrigos entre *P.megistus* e *T.infestans*. Nossos resultados revelam que as duas espécies usam simultaneamente o mesmo abrigo, mesmo na existência de dois abrigos disponíveis. Ambas as espécies se distribuíram aleatoriamente em cada um dos dois abrigos (**Figura 15b e 16 b**), não diferindo do padrão de distribuição das espécies quando isoladas na arena (**Figura 15a e 16a**). Além disso, *P.megistus* manteve sua proporção usual de insetos fora do abrigo, enquanto para *T.infestans* todos os insetos permaneceram no interior dos abrigos (**Figuras 15b e 16b**). Logo, não parece existir qualquer influência da presença de uma espécie no comportamento da outra, sequer um processo de repelência mútua entre essas espécies, como proposto por Neves & Paulini (1982). Haveria indício de repelência caso os insetos das diferentes espécies ocupassem abrigos diferentes, ou ainda, se uma espécie ocupasse os dois abrigos enquanto a outra permanecesse fora dos mesmos.

Neves & Paulini (1982) sugerem que exista um processo de repelência mútua entre *T.infestans*, *P.megistus* e *T.sordida*, mediado pela presença física de barbeiros, pelo odor desses insetos (feromônios) e pelo odor das fezes e urina. Contradizendo esse trabalho, Lorenzo Figueiras and Lazzari (1998) demonstraram que os sinais de agregação presentes nas fezes de *T.infestans*, *T.sordida* e *T.guasayana* provocam a agregação dos insetos inter e intraespecificamente. Ainda em contraste, Pires et al. (2002) demonstraram que *P.megistus* e *T.infestans* são atraídos pelas fezes e por compostos cuticulares (footprints) da outra espécie. O presente trabalho demonstra que a presença física de barbeiros ou odores produzidos pelos mesmos também não desencadeia qualquer resposta de repelência entre *P.megistus* e *T.infestans*.

Nossos resultados são extremamente coerentes com o fato de inexistir uma alta especificidade dos sinais de agregação de tratomíneos, o que tem sido exaustivamente demonstrado em outros trabalhos (Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras & Lazzari 1998, Lorenzo Figueiras 2002, Pires et al. 2002). Em Hemípteros a existência de respostas de agregação intra e interespecíficas não foi demonstrada somente nos triatomíneos. Seis diferentes espécies de pentatomídeos (Hemiptera: Pentatomidae), *Nezara viridula*, *Acrosterum hilare*, *Chlorochroa ligata*, *Chlorochroa sayi*, *Thyanta pallidovirens* e *Euschistus conapertus*, também apresentam esse padrão de resposta comportamental aos sinais de agregação (Fucarino et al. 2004).

Quando ninfas de primeiro estágio de quaisquer duas espécies das citadas anteriormente foram colocadas juntas em arenas circulares, ocorreram respostas de agregação interespecíficas similares às respostas intraespecíficas naturais de cada espécie (Fucarino et al. 2004). Em busca de identificar a composição química dos sinais de agregação, esses autores demonstraram que as diferentes espécies de pentatomídeos possuíam alguns compostos em comum e outros compostos espécie-específicos (Fucarino et al. 2004).

Quando liberamos *P.megistus* inicialmente na arena, com posterior liberação de *T.infestans*, observamos que o padrão de distribuição de ambas as espécies foi conservado (**Figuras 16c e 15d**). Sendo assim, não há qualquer indício de que a ocupação prévia dos abrigos por *P.megistus* tenha afetado o comportamento de *T.infestans*. Pelo contrário, as espécies co-habitaram normalmente nos dois abrigos artificiais e a proporção usual de insetos fora dos abrigos foi observada.

Na série experimental na qual liberamos *T.infestans* inicialmente, com posterior liberação de *P.megistus*, vemos que *T.infestans* manteve seu comportamento invariável (**Figura 15c**). Entretanto, *P.megistus* sofreu um aumento brusco da quantidade de insetos que permaneceu fora dos abrigos (**Figura 16d**). Essa quantidade superou aquela observada com a espécie isolada (**Figura 16a**) ou quando liberada simultaneamente com *T.infestans* (**Figura 16b**). De qualquer forma, as ninfas de *P.megistus* que entraram nos dois abrigos se distribuíram aleatoriamente entre eles (**Figura 16d**) e co-habitaram com *T.infestans* (**Figura 15c**). Sendo assim, não parece ter ocorrido um processo de repelência entre as espécies, entretanto algum fator relacionado à colonização prévia do abrigo fez com que *P.megistus* tivesse seu comportamento alterado.

Provavelmente o fato de o abrigo já estar sendo utilizado há três dias e conseqüentemente estar impregnado com algum sinal químico faz com que a percepção de *P.megistus* do abrigo seja diferente da percepção de um abrigo limpo. Seria possível que, uma vez que *P.megistus* tenha uma tendência a evitar altas densidades no interior do abrigo (**Figura 13**), essa espécie detecte o abrigo pré-colonizado e a potencial presença de sinais químicos no abrigo como indicador de densidade, tendendo a evitá-lo. Esse padrão de comportamento já foi demonstrado para *Blattella germanica* (Suto & Kumada 1981). Papéis de filtro impregnados por sinais de agregação de *B. germanica* são capazes de induzir marcante resposta de agregação em indivíduos desta espécie. Entretanto, quando altas densidades de insetos são utilizados para impregnar os papéis de filtro, *B.germanica* tende a evitá-

los, dispersando-se quando entra em contato com os mesmos (Suto & Kumada 1981).

Para avaliarmos melhor esse resultado, seria interessante realizarmos uma série experimental onde *P.megistus* fosse liberado em duas etapas na arena, ou seja, inicialmente vinte insetos seriam liberados e, após três dias, outros vinte insetos da mesma espécie seriam liberados. Analisaríamos assim, se o padrão de distribuição observado para *P.megistus* nesta série experimental seria similar ou não ao padrão observado para esta espécie quando *T.infestans* foi liberado previamente na arena. Dessa forma, poderíamos avaliar melhor se a variação da proporção de insetos fora do abrigo ocorre pelo fato do abrigo estar pré-colonizado ou se existiria alguma influência de *T.infestans* sobre *P.megistus*.

Caso realmente exista algum processo responsável por certo isolamento espacial entre *P.megistus* e *T.infestans*, apoiamos a hipótese de que seria de ordem competitiva e não mediado por fatores fisiológicos, como sinais visuais e químicos. Aragão (1971) sugere que *P.megistus* competiria em desvantagem com *T.infestans*, o qual estaria mais bem adaptado para ocupar o nicho domiciliário. Pereira et al. (1995) demonstra que *T.infestans* é mais eficiente que *P.megistus* em obter repastos sanguíneos em camundongos não anestesiados, o que poderia estar associado à forte atividade anestésica da saliva de *T.infestans* (Dan et al. 1999). Populações mistas de *T.infestans* e *T.sordida* desenvolvidas em arenas experimentais levam a população de *T.sordida* a decrescer até uma completa desaparecimento após seis meses, enquanto a população de *T.infestans* não é afetada (Oscherov et al. 2001, 2004).

Diferenças de sensibilidade a determinados fatores também poderiam contribuir para a existência de certo isolamento espacial entre *P.megistus* e *T.infestans*. Foi demonstrado que *P.megistus* é mais sensível a choques térmicos que *T.infestans*, sofrendo maior influência das variações bruscas de temperatura sobre o processo de ecdise e a sobrevivência da espécie (Rodrigues et al. 1991, Garcia et al. 1999). *P.megistus* mostra-se muito mais susceptível que *T.infestans* ao efeito da deltametrina, um inseticida piretróide (Diotaiuti et al. 2000). Além disso, foi demonstrado no presente trabalho que *P.megistus* possui maior sensibilidade que *T.infestans* frente a altas densidades de insetos.

O estudo da existência de repelência ou agregação entre *P.megistus* e *T.infestans* pretende esclarecer as contradições existentes na literatura sobre triatomíneos. Nossos resultados, juntamente com resultados prévios obtidos por

Pires et al. (2002) nos levam a concluir que não existe repelência aparente entre *P.megistus* e *T.infestans*.

De fato, já foi reportada a colonização simultânea de habitações pelas duas espécies (Dias 1955), um processo que seria inconcebível caso essas espécies se repelisses mutuamente, como propõem Neves & Paulini (1982). Dias (1955) reporta que entre 1943 e 1953, foram identificados 877 domicílios onde colônias de *P.megistus* e *T.infestans* ocorriam simultaneamente. Dessa forma, caso essas espécies tenham se isolado espacialmente, como sugeriram vários trabalhos posteriores (Dias 1965, 1968, Aragão 1971, Silva 1971, Forattini 1976, Forattini et al. 1977a, 1980), os processos responsáveis por esse isolamento seriam de ordem competitiva ou ainda mediados pelas diferenças comportamentais particulares de cada espécie que levariam a uma distinção de nichos ecológicos.

DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesse estudo podem ser de grande valia para subsidiar as ações de controle da doença de Chagas nas atuais condições epidemiológicas. *P. megistus* é uma das espécies de triatomíneos com maior importância vetorial no Brasil. Uma vez que ocorre no ambiente silvestre e tem demonstrado alta capacidade de colonização do ambiente peridomiciliar e intradomiciliar, as ações de controle focalizadas em seu combate enfrentam um grande desafio. Mesmo após as atividades de borrifação do domicílio com inseticidas existirá sempre a possibilidade de re-colonização dessas habitações por indivíduos provenientes do ambiente silvestre. Visto que não há possibilidade de erradicação completa da espécie, faz-se então necessário um eficiente programa de controle e vigilância epidemiológica, de forma a identificar constantemente qualquer indício de colonização domiciliar e eliminá-lo antes que prolifere. Nesse contexto, estratégias que aumentem a sensibilidade da detecção domiciliar de triatomíneos e facilitem o controle podem exercer uma grande contribuição.

Atualmente a detecção de infestações domiciliares nos programas de controle é realizada basicamente pela procura ativa de triatomíneos e/ou sinais de colonização (fezes, urina e exúvias) (Dias 2002). Em casos de baixa infestação esses métodos podem ser ineficazes e como solução para esse problema tem-se introduzido nas estratégias de detecção o uso de desalojantes químicos como a Pirisa (SUCAM 1980, Steindel et al. 1994).

Outra estratégia, que tem sido utilizada na Argentina, é a instalação de biosensores nas paredes do interior das casas ou anexos peridomiciliares, os quais são revisados regularmente (Gómez-Núñez 1965, García Zapata et al. 1985, Wisnivesky-Colli et al. 1987). Esses sensores consistem basicamente em pequenas caixas de papelão com aberturas laterais, cujo interior oferece um espaço escuro e uma grande superfície de contato, não apresentando cola, nem inseticidas para efeitos de controle. Os insetos encontram os sensores ao acaso e geralmente os escolhem como abrigos (Schofield 1994, Gürtler et al. 1999). Vazquez-Prokopec et al. (2002) sugerem que estes sensores podem inclusive ser produzidos com caixas de leite tipo longa vida, contribuindo para um menor custo da operação, bem como para a reciclagem de lixo. Após um período de aproximadamente seis meses, a entrada previa de triatomíneos no interior destes sensores é determinada através da abertura das caixas e procura de sinais como ovos, excrementos, exúvias ou os próprios insetos que podem permanecer no interior dos dispositivos. Após a detecção, procede-se a borrifação do domicílio e peridomicílio, normalmente com

inseticidas piretróides (Gürtler et al. 1999).

O desenho dos sensores descritos acima poderia ser aperfeiçoado utilizando-se o conhecimento sobre fatores que definem a escolha de abrigos em triatomíneos. A marcante tigmotaxia destes insetos sugere que as caixas sensor devem oferecer em seu interior uma grande superfície de contato e numerosa quantidade de esconderijos. Para isso, pode-se colocar no interior das caixas uma sanfona de papel que apresente furos, como foi adaptado por alguns autores (Wisnivesky-Colli et al. 1987, Candiotti & Paulone 1997). Visto que Reisenman et al. (2000) demonstraram que *T. infestans* escolhe preferencialmente superfícies escuras para repousar ou abrigar-se, sugerimos que as caixas sensor deveriam ser de cor escura para aumentar a sua atratividade para os triatomíneos.

Nossos resultados demonstram que uma alta densidade de insetos no interior de abrigos interfere na probabilidade de escolha dos mesmos. Dessa forma, as caixas sensor devem possuir um tamanho compatível com o número de triatomíneos possivelmente presente nas habitações. Caso o sensor seja ocupado por muitos insetos, atingindo uma alta densidade em seu interior, outros indivíduos podem não entrar. A intensa fototaxia negativa dos triatomíneos, demonstrada não somente neste trabalho, mas em vários outros (Ward & Finlayson 1982, Reisenman et al. 1998, Reisenman 2000), indica que o interior dos sensores deve ser o mais escuro possível. Dessa forma os orifícios de entrada da caixa sensor devem ser planejados de forma que evitem ao máximo a entrada de luz. Todos esses fatores contribuem para que os biosensores constituam abrigos ideais para os triatomíneos.

A associação desse tipo de biosensor com uma isca química que tenha a capacidade de atrair triatomíneos, como a mistura de voláteis desenvolvida neste trabalho, aumentaria significativamente a sensibilidade da detecção e por conseguinte representaria uma melhor ferramenta de controle. No caso particular de *P. megistus*, que mesmo após a borrifação das habitações com inseticida, procede re-colonização (Dias 1965, Forattini et al. 1977a), uma maior sensibilidade de detecção faz-se essencial.

Atualmente, estamos desenvolvendo em nosso laboratório uma matriz de liberação lenta e contínua da mistura de voláteis sintéticos identificados nas fezes, para que possamos realizar estudos de campo. De fato, já estamos testando em dois municípios brasileiros a eficiência de tais dispositivos de liberação dos odores associados com sensores de detecção.

O primeiro município, Piracema, situa-se em Minas Gerais e apresenta um

considerável histórico de detecção domiciliar de *P.megistus*. O segundo município, Arneiroz, situa-se no Ceará e apresenta um notável histórico de infestação domiciliar com *T.brasiliensis* e *T.pseudomaculata*. Em cada uma dessas localidades selecionamos um grupo de casas nas áreas cujo histórico de detecção domiciliar de triatomíneos indicava risco de colonização dos insetos. Nessas casas e/ou em seus anexos peridomiciliares foram instalados pares de biosensores similares àqueles descritos por Wisnivesky-Colli et al. (1987) (**Figura 17**). Consideramos cada par de biosensores como uma unidade experimental, sendo que um dos biosensores possui em seu interior a matriz de liberação impregnada com os odores, enquanto o outro apresenta somente a matriz sem odores, como controle. Dessa forma, pretendemos avaliar se a mistura das substâncias voláteis presentes nas fezes é capaz de aumentar a sensibilidade de detecção de triatomíneos dos biosensores. Caso obtenhamos sucesso nesses estudos, poderíamos propor uma nova ferramenta de detecção de triatomíneos a ser utilizada em programas de controle e vigilância epidemiológica da doença de Chagas.



Figura 17. Biosensor utilizado nos trabalhos de campo em Piracema (MG) e Arneiroz (CE). À esquerda, parte externa apresentando fotografia à escolha do morador (1) e detalhe da abertura lateral (2). À direita, parte interna contendo sanfona de papel com orifícios (3) e dispositivo de liberação lenta e contínua dos odores (4).

Entretanto, estudos mais apurados, tanto em laboratório quanto em campo, são ainda necessários para alcançarmos esse objetivo. Embora estejamos trabalhando com a mistura dos cinco compostos, pretendemos ainda testar se diferentes combinações desses compostos teriam potencial para recrutar insetos ao interior de abrigos. É possível que a presença de todos os compostos não seja necessária para aumentar significativamente a agregação dos insetos em abrigos. Poderíamos, dessa forma, simplificar a mistura de odores, tornando mais prática e econômica sua potencial aplicação em larga escala. Além disso, os estudos comportamentais testando diferentes isômeros de 2,3-butanediol podem ajudar-nos a identificar uma forma mais atrativa desse composto, o que poderia aumentar a sensibilidade de detecção de triatomíneos usando a mistura como isca. Finalmente, precisamos confirmar em campo, se no contexto de agregação em abrigos domiciliares, o comportamento dos triatomíneos é influenciado pela presença da mistura de voláteis de maneira similar àquela observada nos estudos de laboratório.

Posteriormente, seria possível incorporar inseticida aos biosensores iscados com a mistura de voláteis, de forma que o próprio sensor de detecção fosse capaz de atrair e eliminar os triatomíneos no interior dos domicílios. Embora esta seja uma promissora estratégia de controle, uma preocupação que tem surgido atualmente no combate a triatomíneos é a possibilidade de desenvolvimento de resistência a inseticidas. Já foram descritas mais de 500 espécies de insetos e ácaros com resistência a uma ou mais classes de inseticida (Feyereisen 1995, Brogdon & McAllister 1998). Entre os triatomíneos vetores, já foi identificada resistência a inseticidas em *T.infestans* e *R.prolixus*, principais espécies alvo das ações de controle (Zerba 1999, Vassena et al. 2000, Gentile et al. 2004). Mesmo que nesse contexto o uso de inseticidas deva ser evitado, a quantidade de inseticidas utilizada no sensor seria drasticamente menor àquela aplicada na unidade domiciliar. Além disso, o controle seria mais direcionado ao inseto e a dose de inseticida no interior do sensor seria suficiente para matá-lo. Diferentemente de quando se borrifa a casa não ocorreria contato de insetos com doses sub-letais de inseticida. Provavelmente, tudo isso diminuiria a velocidade do processo de desenvolvimento de resistência.

Uma alternativa para evitar o uso de inseticidas seria usar a isca química para atrair os triatomíneos domiciliados ao interior de armadilhas que imitem o desenho do sensor, mas apresentem no interior uma superfície adesiva para aprisionar os insetos. Outra possibilidade seria atraí-los para armadilhas contendo fungos

entomopatogênicos que sejam efetivos em eliminar triatomíneos. Alguns trabalhos já demonstraram a entomopatogenicidade de fungos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em triatomíneos e sugerem que os mesmos poderiam ser utilizados no controle desses vetores (Romaña et al. 1987, Luz et al. 1998, Juarez et al. 2000). Os fungos *Aspergillus giganteus* e *Penicillium corylophilum* possuem efeito entomopatogênico tanto em *P.megistus* quanto em *T.infestans* (da Costa et al. 2003).

O uso de bactérias simbiotes geneticamente transformadas para controlar a infecção dos triatomíneos pelo *T. cruzi* é outra estratégia que vem sendo avaliada para o controle da doença de Chagas (Beard et al. 2002). Simbiotes naturais de triatomíneos, como *Rhodococcus rhodnii*, são geneticamente transformados para que, uma vez no interior do trato digestivo dos insetos, produzam substâncias com ação tripanossomicida (Beard et al. 2002, Dotson et al. 2003). Uma vez que *Rhodococcus rhodnii* é adquirido através de coprofagia pelos estádios ninfais recém eclodidos (Baines 1956), seria possível disseminar a bactéria transgênica em colônias inteiras a partir da infecção de alguns indivíduos. Foi desenvolvido um produto, denominado CRUZIGARD[®], que simula fezes de triatomíneos e possui bactérias transgênicas com ação tripanossomicida (Beard et al. 2002). Esse produto tem sido avaliado como forma de dispersar a bactéria em colônias e os resultados mostram que os insetos são motivados a sugar CRUZIGARD[®] (Beard et al. 2002). Visto que esse produto imita as fezes de triatomíneos, a associação deste com a mistura de substâncias desenvolvida em nosso trabalho, a qual tem sua origem nos sinais de agregação das fezes, provavelmente simularia um contexto semelhante ao natural da coprofagia. Dessa forma, os insetos seriam atraídos pelos voláteis das fezes e quando chegassem à fonte de liberação dos odores encontrariam as fezes sintéticas contendo bactérias com ação tripanossomicida.

Demonstramos neste trabalho que *P.megistus* e *T.infestans* co-habitam no interior de abrigos sem processo aparente de repelência entre as espécies. Além disso, os estudos com *T.infestans* desenvolvidos por nossos colaboradores, demonstraram que a mistura de voláteis sintéticos possui efeito similar nesta espécie ao observado para *P.megistus*, recrutando os insetos para o interior de abrigos (Lorenzo, comunicação pessoal). Dessa forma, ferramentas de detecção e controle que utilizem esses voláteis poderiam ser aplicadas para o controle simultâneo de *P.megistus* e *T.infestans*, nas áreas onde essas espécies possam ocorrer em simpatria. Os estudos com *T.brasiliensis* indicam que a mistura de odores também

possui efeito significativo promovendo a agregação desta espécie no interior de abrigos (Vitta, comunicação pessoal). Assim, a mistura de odores aqui apresentada representa uma isca química multiespecífica que poderia ser utilizada em diferentes regiões no controle de diferentes espécies com relevância epidemiológica.

Deve ser ressaltado que cada espécie de triatomíneo possui suas particularidades comportamentais e que o conhecimento dessas particularidades pode contribuir nas estratégias de controle direcionadas para cada espécie. Nossos resultados demonstram que *P.megistus* possui uma maior tendência a permanecer fora dos abrigos que *T.infestans*. As diferentes intensidades das respostas de fototaxia negativa de *P.megistus* e *T.infestans* provavelmente explicam porque para *P.megistus* permanecer fora do abrigo, mesmo na presença de luz, não seja tão crítico como para *T.infestans*. Este fator poderia tornar *P.megistus* mais visível e dessa forma mais facilmente detectável, seja pelos moradores ou pelos guardas da vigilância epidemiológica. Já *T.infestans*, que dificilmente abandona os abrigos, provavelmente consegue se esconder melhor e demora mais para ser detectado.

Nossos resultados indicam que *P.megistus* possui uma menor tolerância às altas densidades no interior do abrigo que *T.infestans*. Além disso, Pereira et al. (1995) demonstraram que a densidade de insetos interfere de forma mais pronunciada na obtenção de respastos sanguíneos em *P.megistus* do que em *T.infestans*. A densidade de insetos possui uma influência no número de indivíduos que permanece fora dos abrigos, tanto em *P.megistus* quanto em *T.infestans*. Sendo assim, podemos esperar que quanto maior for o tamanho da colônia domiciliar, maior será o número de insetos que sairão dos abrigos e dessa forma estarão visíveis, facilitando a detecção. No caso de *P.megistus*, isso provavelmente acontecerá em densidades sensivelmente menores.

A saída de insetos de seu abrigo de origem poderia ser impulsionada por uma motivação para a procura de novos abrigos. O estudo da distribuição de *P.megistus* e *T.infestans* em abrigos revelou que esses triatomíneos, na presença de dois abrigos, se distribuem homoganeamente entre esses refúgios. Essa tendência a se distribuir entre os abrigos parece ser independente da densidade, visto que 20 insetos, uma densidade pequena, se distribuem em proporções iguais nos dois abrigos. Dessa forma, poderíamos esperar que os triatomíneos, pelo menos das espécies estudadas, distribuam-se nos abrigos em determinado ambiente de acordo com a disponibilidade e número de abrigos existentes. Sendo assim, uma casa infestada pode apresentar colônias distribuídas em diversos locais, o que dificulta a

eliminação desses insetos. Isso reforça a necessidade de se fazer uma cobertura completa da casa ao borrifar a unidade domiciliar com inseticida mesmo quando um único inseto for detectado.

Sabe-se que as colônias domiciliares de *T.infestans* podem chegar a mais de 3.000 insetos, enquanto as de *P.megistus* jamais atingem sequer a metade dessa proporção (Marsden 1980). Esses dados podem estar relacionados à maior tolerância de *T.infestans* às altas densidades de insetos. Além disso, o fato de *P.megistus* permanecer fora dos abrigos com maior frequência que *T.infestans* e dessa forma, ser mais facilmente detectado, pode contribuir para que as colônias intradomiciliares desta espécie nunca atinjam grandes tamanhos. Cabe ainda ressaltar que *T.infestans* mostra-se uma espécie extremamente bem adaptada ao ambiente domiciliar e que parece competir em vantagem contra outras espécies na exploração de recursos (Aragão 1971, Pereira et al. 1995, Oscherov et al. 2001, 2004).

Vários trabalhos sugerem isolamento espacial ou substituição de nichos entre *P.megistus* e *T.infestans* (Dias 1965, 1968, Aragão 1971, Silva 1971, Forattini 1976, Forattini et al. 1977a, 1980). A maioria desses trabalhos teve como referência dados epidemiológicos de áreas onde a borrifação das casas com inseticidas estava sendo realizada. Não sabemos até que ponto os inseticidas poderiam influenciar na ocorrência de *P.megistus* ou *T.infestans* nas habitações. Já foi demonstrada a existência de uma marcante diferença de susceptibilidade à deltametrina entre *T.infestans* e *P.megistus* (Diotaiuti et al. 2000). Tanto a porcentagem de insetos paralisados por baixas doses de deltametrina (2,5 mg ai/m²), quanto a porcentagem de insetos mortos por doses maiores (5 mg ai/m²), revelou que *P.megistus* é muito mais susceptível que *T.infestans* (Diotaiuti et al. 2000). Esses autores também estudaram as respostas comportamentais de *P.megistus* e *T.infestans* quando em contato com baixas doses de deltametrina e demonstraram que estas doses produziam excito-repelência nesses insetos. Entretanto, diferentemente de *T.infestans*, *P.megistus* apresentou não somente um aumento da atividade locomotora, mas ainda realizou tentativas de vôo como forma de escapar das superfícies tratadas com inseticida. Diotaiuti et al. (2000) sugerem que a deltametrina, mesmo em doses sub-letais, poderia inibir a recolonização de habitações por *P.megistus* proveniente de ecótopos silvestres.

Não encontramos na literatura dados que esclareçam ou demonstrem nitidamente a existência de processos de repelência entre *P.megistus* e *T.infestans*.

Este trabalho, juntamente com os dados de outros autores (Pires 2002), demonstra que não existe qualquer processo de repelência química entre essas duas espécies. Dessa forma, o isolamento espacial sugerido por alguns trabalhos (Dias 1965, 1968, Aragão 1971, Silva 1971, Forattini 1976, Forattini et al. 1977a, 1980) não pode ser explicado por processos químicos e provavelmente estaria relacionado a processos de ordem competitiva. Nossos resultados, bem como resultados de outros trabalhos (Aragão 1971, Pereira 1995), sugerem que *T.infestans* estaria mais adaptado que *P.megistus* para ocupar o nicho domiciliário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão MB 1961. Aspectos climáticos, da doença de Chagas. II - Área de ocorrência do *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 13: 171-193.
- Aragão MB 1971. Sobre a dispersão do *Triatoma infestans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 5: 183-91.
- Baines S 1956. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J Exp Biol* 33: 533-541.
- Baldwin WF, Knight AG, Lyn KR 1971. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Entomologist* 10: 18-22.
- Barbosa SE, 2004. Biosistemática e biogeografia de populações de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- Barret TV 1976. Parasites and Predators of Triatominae. *Scientific Publication n° 318. Pan-American Health Organization*, Washington DC.
- Barret TV, Hoff R, Mott KE, Guedes F, Sherlock IA 1979. An outbreak of acute Chagas disease in the São Francisco valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 703-709.
- Barretto MP 1979. Epidemiologia. In Z Brener, Z Andrade. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. P.89-151.
- Barrozo RB 2003. Orientación al hospedador en la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae): claves sensoriales responsables. Tese de Doutorado, Universidade de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Barrozo RB, Manrique G, Lazzari CR 2003. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J Insect Physiol*, 49: 315-321.
- Barrozo RB, Lazzari CR 2004. Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chem Senses* 29: 833-41.

- Barrozo RB, Minoli SA, Lazzari CR 2004. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *J Insect Physiol* 50: 249-254.
- Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV 2002. Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol* 47: 123-141.
- Birch MC, Haynes KF 1982. Insect pheromones. The Institute of Biology. Studies in biology, 147, p.60.
- Brogdon WG, McAllister JC 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4: 605-613.
- Candioti C, Paulone I 1997. Santa Fé triatomine bug detector. A high sensitivity and low cost design. *Medicina (B Aires)* 57: 433-436.
- Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock IA, Girón IG, Jurberg J, Galvão C, Segura CAM, Noireau F 1999. Distribuição geográfica e dispersão altitudinal. In RU Carcavallo, I Galindez Girón, J Jurberg, H Lent, *Atlas of Chagas' disease vector in the Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro. P.747-792.
- Castro Filho J, Silveira AC 1979. Distribuição da doença de Chagas no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 29: 85-98.
- Chapman RF 1998. The insects: structure and function, 4th ed., Cambridge University Press, UK, 700 pp.
- Cruz-López L, Malo EA, Rojas JC 1993. Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 535-539.
- Cruz-López L, Morgan ED 1995. Chemical investigations of aggregation behaviour of *Triatoma* bugs (Hemiptera:Reduviidae). *J Chem Ecol* 21: 2069-2078.
- Da Costa GL, de Moraes AM, Galvão C 2003. Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *J Basic Microbiol* 43: 3-7.

- Dan A, Pereira MH, Pesquero JL, Diotaiuti L, Beirao PS 1999. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol* 36:875-879.
- De Brito Sánchez MG, Manrique G, Lazzari CR 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) II. Electrophysiological correlates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 649-651.
- Denzer DJ, Fuchs MEA, Stein G 1988. Zum Verhalten von *Blattella germanica* (L.): Aktionsradius und Refugientreue. *J Appl Entomol* 105: 303-343.
- Di Primo RF 1955. Distribuição do *Panstrongylus megistus* no Rio Grande do Sul. *Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre* 15: 39-58.
- Dias E 1955. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e do *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. *Separatas de Mem Inst Oswaldo Cruz* 53: Fascículos 2,3 e 4.
- Dias E, Zeledón R 1955. Infestação domiciliar em grau extremo por *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 53: 457-472.
- Dias JCP 1965. Reinfestação do município de Bambuí por triatomíneos transmissores da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 63: 109-119.
- Dias JCP 1968. Reinfestação do município de Bambuí por triatomíneos transmissores da doença de Chagas (Segunda Nota). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 66: 197-208.
- Dias JCP, Dias E 1968. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. IIª Nota: 1951-1964. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 66: 209-226.
- Dias JCP 1982. Estudos clínico-epidemiológicos a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 374 pp.
- Dias JCP 2002. O controle da doença de Chagas no Brasil, In: SILVEIRA AC (org.), Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG. El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América: 145-250.

- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Dicke M, Sabelis MW 1988. Infochemical Terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funct Ecol* 2: 131-139.
- Diotaiuti L, Pereira AS, Loiola CF, Fernandes AJ, Schofield CJ, Dujardin JP, Dias JCP, Chiari E 1994. A colonização intradomiciliar por triatomíneos altera a história natural do *Trypanosoma cruzi*. In: X Reunião Aplicada em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 105-107.
- Diotaiuti L, Penido CM, Araújo HS, Schofield CJ, Pinto CT 2000. Excito-repellency effect of deltamethrin on triatomines under laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 247-252.
- Dotson EM, Plikaytis B, Shinnick TM, Durvasula RV, Beard CB 2003. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements the L1 mycobacteriophage. *Infect Genet Evol* 3: 103-109.
- Dujardin JP, Bermudez H, Schofield CJ 1997. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica* 66: 145-153.
- El-Sayed A, Liblikas I, Unelius RF 2000. Light and molecular modeling study on the response of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) to (E,E)-8,10-dodecadien-1-ol and its geometrical isomers. *Z Naturforsch [C]* 55: 1011-7.
- Feyereisen R 1995. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett* 82-83: 83-90.
- Fichera LE, Gomez A, Estani SS, Segura EL 1997. La estrategia de la participación comunitaria con tecnología apropiada para el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas. In: Reunión sobre vectores de la enfermedad de Chagas y cambio climático global. *Acta Toxol Argent* 5: 40-41.
- Foil LD, Hogsette JA 1994. Biology and control of Tabanids, Stable Flies and Horn Flies. *Rev Sci Tech Oie* 13: 1125-1158.

- Forattini OP 1972. Entomogeografia médica do Brasil. In Lacaz CS. Introdução à Geografia Médica do Brasil. Edgar Blucher/USP, São Paulo. p.191-212.
- Forattini OP 1976. Effects of control measures on vector populations dynamics. In: International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Belo Horizonte, 1975. Proceedings. Washington, D. C., Pan-American Health Organization, 1976, p.2113.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Rabello EX 1977a. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. VIII – Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e sua presença extradomiciliar. *Rev Saúde Pública* 12: 73-286.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Rabello EX, Santos JLF, Patolli GB 1977b. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. IX – Variação e mobilidade de *Panstrongylus megistus* em ecótopos artificiais. *Rev Saúde Pública* 11: 199-213.
- Forattini OP, Rocha e Silva EO, Rabello EX, Santos JLF, Lima AR 1977c. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XI – Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e potencial enzoótico. *Rev Saúde Pública* 11: 527-550.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Rabello EX 1978. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XII - Variações mensais da tendência de *Panstrongylus megistus* à domiciliação. *Rev Saúde Pública São Paulo* 12: 209-233.
- Forattini OP, Santos JLF, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Rabello EX 1979. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XVI - Dispersão e ciclos anuais de colônias de *Triatoma sordida* e de *Panstrongylus megistus* espontaneamente desenvolvidas em ecótopos artificiais. *Rev Saúde Pública São Paulo* 13: 299-313.
- Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Pública São Paulo* 14: 265-299.
- Forattini OP, Barata JLS, Santos JLF, Silveira AC 1981. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na região nordeste do Brasil. *Rev Saúde Pública* 15: 113-164.

- Forattini OP, Barata JLS, Silveira AC 1982. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na região central do Brasil. *Rev Saúde Pública São Paulo* 16: 171-204.
- Forero D, Weirauch C, Baena M 2004. Synonymy of the Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa* 670: 1–12.
- Fucarino A, Millar JG, McElfresh JS, Colazza S 2004. Chemical and physical signals mediating conspecific aggregation behaviour of first instar stink bugs. *J Chem Ecol* 30: 1257-1269.
- Galvão C, Carvalho R, Rocha DS, Juberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Garcia SL, Rodrigues VLCC, Garcia NL, Ferraz Filho AN, Mello MLS 1999. Survival and Molting Incidence after Heat and Cold Shocks in *Panstrongylus megistus* Burmeister. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 131-137.
- García Zapata MT, Schofield CJ, Marsden PD 1985. A simple method for detecting the presence of live triatomine bugs in houses sprayed with insecticides. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 558-559.
- Geier M, Bosch OJ, Boeckh J 1999. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chem Senses* 24: 647-653.
- Gemeno C, Leal WS; Mori K, Schal C 2003. Behavioral and electrophysiological responses of the brownbanded cockroach, *Supella longipalpa*, to stereoisomers of its sex pheromone, supellapyrone. *J Chem Ecol* 29: 1797-811.
- Gentile AG, Sartini JL, Campo MC, Sanchez JF 2004. Efficacy of Fipronil in the control of the peridomiciliary cycle of *Triatoma infestans* in an area resistant to Deltamethrin. *Cad Saúde Pública* 20: 1240-1248.
- Gómez-Núñez JC 1965. Desarrollo de un nuevo método para evaluar la infestación intradomiciliaria por *Rhodnius prolixus*. *Acta Cient Venez* 16: 26-31.

- Grenacher S, Krober T, Guerin PM 2001. Behavioural and chemoreceptor cell responses of the tick, *Ixodes ricinus*, to its own faeces and faecal constituents. *Exp Appl Acarol* 25: 641-660.
- Guerestein PG, Guerin PM 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *J Exp Biol* 204: 585-597.
- Gürtler RE, Cécere MC, Canale DM, Castañera MB, Chuit R, Cohen JE 1999. Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas' disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Trop* 72: 213-234.
- Ishii S, Kuwahara Y 1967. An aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattidae). Site of pheromone production. *Appl Ent Zool* 2: 203-217.
- Jeanson R, Rivault C, Deneubourg JL, Blanco S, Fournier R, Jost C, Theraulaz G 2005. Self-organized aggregation in cockroaches. *Anim Behav* 69: 169-180.
- Juarez MP, Crespo R, Fernandez GC, Lecuona R, Cafferata LF 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. *J Invertebr Pathol* 76: 198-207.
- Jurenka RA, Schal C, Burns E, Chase J, Blomquist GJ 1989. Structural correlation between cuticular hydrocarbons and female contact sex pheromone of german cockroach *Blattella germanica* (L.). *J Chem Ecol* 15: 939-949.
- Kalin M, Barrett F 1975. Observations on the anatomy, histology release sites and function of Brindleys glands in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Heteroptera:Reduviidae). *Ann Entomol Soc Am* 68: 126-134.
- Knols BGJ, van Loon JJA, Cork A, Robinson RD, Adam W, Meijerink J, DeJong R, Takken W 1997. Behavioural and electrophysiological responses of the female malaria mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to Limburger cheese volatiles. *B Entomol Res* 87: 151-159.
- Lazzari CR 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 38: 895-903.

- Leathy MG, Sternberg S, Mango C, Galun R 1973. Assembly pheromones in the soft tick *Argas persicus* (Oken). *Nature* 246: 515-516.
- Lorenzo Figueiras AN, Kenigsten A, Lazzari CR, 1994. Agregation in haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J Insect Physiol* 40: 312-316.
- Lorenzo Figueiras AN, Lazzari C 1998. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiol Entomol* 23: 33-37.
- Lorenzo Figueiras AN, Lazzari C 2000. Temporal change of the aggregation response in *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 889-892.
- Lorenzo Figueiras NA, Lazzari C 2002a. Aggregation behaviour and interespecific responses in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 569-571.
- Lorenzo Figueiras NA, Lazzari C 2002b. Aggregation behaviour and interespecific responses in three species of Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 133-137.
- Lorenzo MG, Lazzari CR 1996. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J Insect Entomol* 42: 903-907.
- Lorenzo MG, Lazzari CR 1998. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop* 70: 163-170.
- Lorenzo MG, Lazzari CR 1999. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Trop* 72: 241-249.
- Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CM, Aljanabi SM 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 93: 839-846.
- Manrique G, Lazzari CR 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I. Behavioural evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 645-648.
- Marsden PD 1980. Doença de Chagas – Ecologia domiciliar dos principais vetores no Brasil. *J Bras Med* : 17-22.

- Meijerink J, Braks MAH, Van Loon JJA 2001. Olfactory receptors on the antennae of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* are sensitive to ammonia and other sweat-borne components. *J Insect Physiol* 47: 455-464.
- Miles MA 1976. Distribution and importance of triatominae as vector of *Trypanosoma cruzi*. In: American Trypanosomiasis Research. Washington, DC. Pan American Health Organization – Scientific Publication 318. p. 48-51.
- Minter DM 1976. Feeding patterns of some triatomine vector species. New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Washington, DC: Pan American Health Organization – Scientific Publication 318. p. 33-47.
- Moncayo A 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 401-404.
- Murphy MW, Dunton RF, Perich MJ, Rowley WA 2001. Attraction of *Anopheles* (Diptera: culicidae) to volatile chemicals in Western Kenya. *J Med Entomol* 38: 242-244.
- Neves DP, Paulini E 1982. Repelência entre *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae) por ação de feromônio. *Rev Bras Entomol* 26: 349-354.
- Núñez JA 1982. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Bull Ent Res* 72: 252-262.
- Núñez JA 1987. Behaviour of Triatominae bugs. In RR Brenner, AM Stoka, *Chagas Disease Vectors*. CRC Press, Florida. P.1-28.
- Obeng-Ofori D, Torto B, Njagi PGN, Hassanali A, Amiani H 1994. Fecal volatiles as part of the aggregation pheromone complex of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *J Chem Ecol* 20: 2077-2087.
- Ondarza RN, Gutierrez-Martinez A, Malo EA 1986. Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J Econom Entomol* 79: 688-692.

- Oscherov EB, Damborsky MP, Bar ME, Avalos G, Alvarez BM, Presman H, Wisnivesky-Colli C 2001. Interactions between *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in artificial ecotopes: population growth and age structure. *J Med Entomol* 38: 214-217.
- Oscherov EB, Damborsky MP, Bar ME, Gorla DE 2004. Competition between vectors of Chagas disease, *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida*: effects on fecundity and mortality. *Med Vet Entomol* 18: 323-328.
- Park JH, Han KS, Mori K, Boo KS 2002. Right stereoisomers for sex pheromone components of the apple leafminer, *Lyonetia prunifoliella*, in Korea. *J Chem Ecol* 28: 2515-25.
- Pellegrino J, Brenner Z 1951. Profilaxia de um foco de doença de Chagas nas proximidades de Belo Horizonte (Cidade Industrial). *Rev Assoc Med Minas Gerais* 2: 233-250.
- Pereira MH, Penido CM, Martins MS, Diotaiuti L 1995. *Triatoma infestans* is more efficient than *Panstrongylus megistus* in obtaining blood meals on non anaesthetized mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 765-767.
- Pessoa SB 1962. Domiciliação de triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. *Arq Hig Saúde Pública* 27: 161-171.
- Pires HHR, Lorenzo MG, Diotaiuti L, Lazzari CR, Lorenzo Figueiras AN 2002. Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. *Acta Trop* 81: 47-52.
- Pires HHR, Lorenzo MG, Lazzari CR, Diotaiuti L, Manrique G 2004. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 295-300.
- Poinar Jr G 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatide Vector Association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 72-81.

- Priyantha DC, Wimalaratne D; Keith N, Slessor L 2004. Chiral Synthesis of (Z)-3-cis-6,7-cis-9, 10-Diepoxyhenicosenes, Sex Pheromone Components of the Satin Moth, *Leucoma salicis*. *J Chem Ecol* 30: 1225-1244.
- Punukollu G, Gowda RM, Khan IA 2004. Early twentieth century descriptions of the Chagas heart disease. *Int J Cardiol* 95: 347-349.
- Rajendran S 1999. Detection of insect infestation in stored food commodities. *J Food Sci Tech Mys* 36: 283-300.
- Reisenman CE, Lazzari CR, Giurfa M 1998. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Comp Physiol [A]* 183: 533-541.
- Reisenman CE, Lorenzo Figueiras AN, Giurfa M, Lazzari CR 2000. Interaction of visual and olfactory cues in the aggregation behaviour of the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Comp Physiol [A]* 183: 533-541.
- Reisenman CE, Insausti T, Lazzari C 2002. Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Exp Biol* 205: 201-210.
- Ritter FJ, and Persoons CJ 1975. Recent development in insect pheromone research, in particular in the Netherlands. *Neth J Zool* 25: 261-275.
- Rivault C, Cloarec A 1998. Cockroach aggregation: discrimination between strain odours in *Blattella germanica*. *Anim Behav* 55: 177-184.
- Rodrigues VLCC, Mello MLS, Filho ANF, Dantas MM 1991. Survival and molting incidence in *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) after temperature shocks. *Rev Saúde Pública* 25: 461-467.
- Romaña CA, Fargues J, Pays JF 1987. Method of biological control of Tratominae, vectors of Chagas disease, using entomopathogenic Hyphomycetes. Preliminary study. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 80: 105-111.
- Ross MH, Tignor KR 1986. Response of German cockroaches to aggregation pheromone emitted by adult females. *Entomol Exp Appl* 41: 25-31.

- Rossiter M, Staddon BW 1983. 3-methyl-2-hexanone from the triatomine bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera:Reduviidae). *Experientia* 39: 380-381
- Samuka M, Fukami H 1990. The aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattelidae): Isolation and identification of the attractant components of the pheromone. *Appl Ent Zool* 25: 355-368.
- Samuka M, Fukami H 1991. Aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattelidae): Choice-chamber assay for arrestant component(s). *Appl Ent Zool* 26: 223-235.
- Samuka M, Fukami H 1993. Aggregation arrestant pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattelidae): Isolation and structure elucidation of blattellastanoside-A and B. *J Chem Ecol* 19: 2521-2541.
- Schofield CJ, Patterson JW 1977. Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 13: 727-734.
- Schofield CJ 1979. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A Review. *Bull Entomol Res* 69: 363-379.
- Schofield CJ 1988. Biosystematics of the Triatominae. In MW Service, *Biosystematics of Haematophagous Insects*, Clarendon Press, Oxford. P.284-312.
- Schofield CJ 1994. *Triatominae. Biología y control*, Eurocommunica Publications, UK, 77 pp.
- Schofield CJ, Dias JCP 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas Disease. *Adv Parasitol* 42: 1-27.
- Sherlock IA 1979. Vetores. In Z Brener, Z Andrade, *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.42-88.
- Silva EOR, Maluf J, Corrêa RR 1971. La enfermedad de Chagas – Vigilancia Etomológica en el Estado de São Paulo, Brasil. *Bol Oficina Sanit Panam* 71: 387-401.

- Steindel M, Toma HK, de Carvalho Pinto CJ, Grisard EC, Schlemper BRJ 1994. Colonization of artificial ecotopes by *Panstrongylus megistus* in Santa Catarina Island, Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 43-50.
- Stejskal V 1997. Distribution of faeces of the German cockroach, *Blattella germanica*, in a new refuge. *Entomol Exp Appl* 84: 201-205.
- Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) – Ministério da Saúde (1980). Manual de normas técnicas da campanha de controle da doença de Chagas. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, Brasília. P.43-45.
- Suto C, Kumada N 1981. Secretion of dispersion-inducing substance by the German-Cockroach, *Blattella germanica* L (Orthoptera, Blattellidae). *Appl Entomol Zool* 16: 113-120.
- Taneja J, Guerin PM 1995. Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. *J Comp Physiol [A]* 176: 455-464.
- Taneja J, Guerin PM 1997. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *J Comp Physiol [A]* 181: 21-34.
- Torto B, Njagi PGN, Hassanali A, Amiani H 1996. Aggregation pheromone system of nymphal gregarious desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.) *J Chem Ecol* 22: 2273-2281.
- Vale GA, Lovemore DF, Flint S, Cockbill GF 1988. Odour baited targets to control tse-tse flies *Glossina spp.* (Diptera: Glossinidae) in Zimbabwe. *Bull Entomol Res* 78: 31-49.
- Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN 2000. Insecticide resistance in brazilian *Triatoma infestans* and venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol* 14: 51-55.
- Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Salomón OD, RE Gurtler 2002. Field trials of an improved cost-effective device for detecting peridomestic populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 01-07.

- Vinhaes MC, Dias JCP 2000. Chagas disease in Brazil. *Cad Saúde Pública* 16: 7-12.
- Vitta ACR, Figueiras NA, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG 2002. Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 865-867.
- Vitta ACR, Mota TRP, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG 2005. The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). *Acta Trop*, submetido.
- Ward JP, Finlayson LH 1982. Behavioural responses of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to visual stimuli. *Bull Entomol Res* 72: 357-366.
- Weiss MR 2006. Defecation behaviour and ecology of insects. *Annu Rev Entomol* 51:635–661.
- Wertheim B 2005. Evolutionary ecology of communication signals that induce aggregative behaviour. *Oikos* 109: 117-124.
- Wertheim B, Erik-Jan AVB, Dicke M, Vet LEM 2005. Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary and ecological perspective. *Annu Rev Entomol* 50: 321-346.
- WHO (2005) *World Health Organization*, http://www.who.int/topics/chagas_disease/en. Available from: <http://www.who.int/en/> (acesso em 12 de janeiro).
- Wisnivesky-Colli C, Paulone I, Perez A, Chuit R, Gualtieri J, Solarz N, Smith A, Segura EL 1987. A new tool for continuous detection of the presence of triatomine bugs, vectors of Chagas disease, in rural households. *Medicina (B Aires)* 47: 45-50.
- Zeledón R, Rabinovich J 1981. Chagas' disease: An Ecological Appaisal With Special Emphasis on its Insect Vectors. *Ann Rev Entomol* 26: 101-133.
- Zerba EN 1999 Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina (B Aires)* 59: 41-46.

Produção tecnológico-científica relacionada aos dados apresentados nesta dissertação:

Vitta ACR, Mota TRP, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG. Depósito de pedido de registro no INPI: Isca química para detecção e controle de triatomíneos. Patente nº (INPI): 012349. Data de depósito: 02-12-2003.

Mota TRP and Lorenzo MG. Use of shelters and interspecific interactions between *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*. Em preparação para ser submetido.

Mota TRP, Vitta ACR, Figueiras ANL, Barezani CP, Zani CL, Lazzari CR, Diotaiuti L and Lorenzo MG. Aggregation to chemical signals from feces in three vectors of Chagas disease, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*. Identification of substances and their use for recruiting insects into refuges. Em preparação para ser submetido.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein