

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

Uso de abrigos em espécies do gênero *Rhodnius*

por

Katherine Dayann Mosquera Duran

Belo Horizonte

2017

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR

K.D.M. DURAN

2017

KATHERINE DAYANN MOSQUERA DURAN

Uso de abrigos em espécies do gênero *Rhodnius*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

Belo Horizonte

2017

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

D948u Duran, Katherine Dayann Mosquera.
2017

Uso de abrigos em espécies do gênero *Rhodnius* /
Katherine Dayann Mosquera Duran. – Belo Horizonte,
2017.

xii, 43 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 39 - 43

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

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Trypanosoma*
cruzi/parasitologia 3. Triatominae/patogenicidade I.
Título. II. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

KATHERINE DAYANN MOSQUERA DURAN

Uso de abrigos em espécies do gênero *Rhodnius*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (CPqRR /FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Theo Rolla Paula Mota (UFMG) Titular

Prof. Dr. Fabiano Duarte Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 16/02/2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Diego e Sandra e minha irmã
Dennisse, este grande sonho que agora é uma
realidade está dedicado totalmente a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcelo Lorenzo, pela orientação, pelo entusiasmo, tempo e paciência com que me transmitiu seus valiosos conhecimentos em nossas longas conversas. Obrigada pela oportunidade e confiança ao abrir as portas do laboratório e por acreditar em mim.

À Dra. Taynãna César Simões e à Thaís Claudino Viana pela disponibilidade e contribuição nas análises estatísticas.

À Dra. Anita Villacís, minha ex-orientadora e querida amiga, por me apresentar ao mundo dos triatomíneos e à vida acadêmica, por me incentivar a tentar grandes desafios e nunca duvidar do meu trabalho e capacidade.

Ao Dr. Luis Martínez, pela paciência e ajuda, conhecimentos compartilhados, conversas científicas e não científicas, cafezinhos, jantares, pela torcida em todo momento e pela grande amizade.

Aos meus queridos amigos Luciana e Newmar, pela disponibilidade e paciência para me ajudar quando cheguei ao laboratório e durante todo este tempo. Obrigada Lu e New pela valiosa amizade que me brindaram, pelo carinho, preocupação e constante apoio.

À Raíssa, minha irmãzinha brasileira, por todos os momentos compartilhados, pela ajuda e conselhos, por estar comigo comemorando nos momentos de alegria e assim mesmo por ser um constante apoio quando as coisas não foram fáceis. Muito obrigada pela linda amizade que a gente tem.

Aos colegas e membros do grupo de Comportamento de Vetores e do grupo Triatomíneos; todos vocês colaboraram de uma ou outra forma com troca de ideias, empréstimo de barbeiros, conversas, almoços, confraternizações, enfim, agradeço a cada um por fazer o dia a dia no laboratório muito mais divertido.

Aos meus queridos amigos da turma do mestrado, Mari, Karine, Thaís, Natalinha, Gabriel, e Aline, muito obrigada a todos vocês pelo carinho, pela amizade, pelas reuniões de estudo, pelo conhecimento trocado, pelos momentos de descontração e por me ajudar em tudo o que precisei.

À Verónica, que mesmo vindo de Quito, a vida só nos juntou em Belo Horizonte. Pela amizade, apoio e pelas experiências divertidas que vivemos juntas neste tempo.

Ao Diego, por todo o carinho, compreensão e incentivo nesta etapa. Obrigada por tornar meus dias mais felizes e especiais. Agradeço também a sua família pelo apoio, carinho e momentos de descontração compartilhados.

Aos meus pais, Diego e Sandra, pelo amor e apoio incondicionais. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos e por todo o esforço que têm feito para que eu consiga alcançar cada um desses. À minha irmã Dennisse, pela constante torcida, palavras de apoio nos momentos difíceis e por sempre me lembrar do orgulho que sente pelas minhas conquistas.

Ao Brasil, através do seu Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação PEC-PG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade que brinda aos estudantes estrangeiros visando o aumento de qualificação necessária para que, em um futuro, possamos contribuir para o melhor desenvolvimento dos nossos países.

RESUMO

Os triatomíneos são insetos vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Espécies pertencentes ao gênero *Rhodnius* têm sido reportadas habitando ambientes domésticos e peridomésticos em diferentes regiões da América Latina. No entanto, aspectos comportamentais e de ecologia sensorial relacionados ao uso de abrigos têm sido pouco estudados nestas espécies. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os fatores que afetam a escolha de abrigos e o uso de sinais de agregação em quatro espécies do gênero *Rhodnius*. Utilizando arenas experimentais e abrigos artificiais, foi avaliado se a densidade de insetos e as condições de iluminação podem influenciar na tendência de *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus* a permanecer em refúgios. Além disso, testamos a capacidade das fezes em promover a eleição do abrigo nas mesmas espécies e também em *R. ecuadoriensis*. Finalmente, avaliamos se a isca química sintética, desenvolvida a partir das fezes de *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *T. brasiliensis*, é capaz de induzir a escolha de abrigos por *R. prolixus*. Os resultados mostraram que tanto a densidade de insetos quanto a presença de um ciclo de luz afetam diferencialmente cada espécie, reagindo de maneira particular na tendência a ocupar refúgios. Por outro lado, evidenciou-se que os sinais químicos fecais parecem não ter papel crucial na marcação química de refúgios para triatomíneos deste gênero, uma vez que nenhuma das espécies avaliadas se agregou preferencialmente em abrigos associados às suas fezes. Adicionalmente, a mistura química sintética não foi capaz de induzir a escolha de refúgios em nenhuma das doses testadas com ninfas de *R. prolixus*. Com os resultados obtidos neste estudo foi possível determinar perfis espécie-específicos de exploração e uso de refúgios definidos por fatores como a tigmotaxia, fototaxia negativa e uso de sinais químicos. Assim, os dados demonstram que é necessário caracterizar os diversos aspectos do comportamento de insetos vetores, evitando as generalizações não baseadas em dados experimentais; isso porque as diferenças observadas entre as espécies estudadas provavelmente tenham impacto na capacidade para colonizar ambientes humanos.

Palavras chaves: comportamento, marcas químicas, abrigos, *Rhodnius*.

ABSTRACT

Triatomines are insect vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease. Species belonging to the genus *Rhodnius* have been reported inhabiting domestic and peridomestic environments in different regions of Latin America. However, behavioral and sensorial ecology aspects related to their use of shelters have been poorly studied in these species. The objective of the present study was to characterize the impact of factors related to the choice of shelters and the use of aggregation signals in four species of genus *Rhodnius*. Using experimental arenas and artificial shelters it was evaluated how exposure to different insect densities and light regimes can influence the tendency of *R. prolixus*, *R. neglectus* and *R. robustus* to remain inside refuges. In addition, we tested the capacity of feces to promote shelter selection in the same three species and also in *R. ecuadoriensis*. Finally, we evaluated whether a synthetic chemical bait developed based on the odor profile of the feces of *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* and *T. brasiliensis* is able to induce *R. prolixus* to choose shelters associated with it. The results showed that both insect density, and the presence of a light cycle affected how each species particularly tends to select and occupy a shelter differentially. On the other hand, it was evidenced that fecal chemical signals do not seem to have a crucial role in the chemical marking of shelters in insects of this genus, since none of the evaluated species showed significant preference to hide inside shelters associated with their feces. Additionally, it was shown that the synthetic chemical mixture was not able to induce the choice for baited shelters on *R. prolixus* nymphs for any of the doses tested. With the results obtained in this study it was possible to determine species-specific profiles of exploration and use of refuges defined by factors such as thigmotaxis, negative phototaxis and use of chemical signals. Thus, the data demonstrate that it is necessary to characterize the different aspects of the behavior of insect vectors, avoiding generalizations not based on experimental data. We consider that the differences observed among the species studied could impact their ability to colonize human environments.

Key words: behavior, chemical marks, shelters, *Rhodnius*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efeito da densidade.** Proporção média de ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* encontrada fora do abrigo.27
- Figura 2. Efeito do ciclo de iluminação.** Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* encontradas fora do abrigo sob ciclo de luz/escuridão (12/12 LE) ou escuridão completa. As barras representam os erros padrão das médias.....29
- Figura 3. Agregação em abrigos e o efeito potencial das fezes.** Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius ecuadoriensis* encontradas dentro dos abrigos experimentais (fezes) e controle. As barras representam os erros padrão das médias.....30
- Figura 4. Agregação em abrigos associados a fezes com ou sem urina.** Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus* encontradas dentro dos abrigos experimentais (fezes com ou sem urina) e controle. As barras representam os erros padrão das médias.....31
- Figura 5. Potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo.** Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus* encontradas dentro dos abrigos experimentais (mistura química) e controle. As barras representam os erros padrão das médias.32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de p (teste de Tukey) para comparações par a par entre os resultados das diferentes densidades testadas para <i>Rhodnius neglectus</i> e <i>Rhodnius robustus</i>	27
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA _____	13
2 OBJETIVOS _____	20
2.1 Objetivo geral _____	20
2.2 Objetivos específicos _____	20
3 METODOLOGIA _____	21
3.1 Manutenção e padronização dos insetos _____	21
3.2 Efeito da densidade de insetos e da iluminação sobre o uso de abrigos ____	21
3.2.1 Avaliação do efeito da densidade _____	21
3.2.2 Avaliação do efeito da iluminação _____	22
3.3 A escolha de abrigos e o uso de marcas químicas de agregação em espécies do gênero <i>Rhodnius</i> . _____	23
3.3.1 Agregação em abrigos e o efeito potencial das fezes _____	23
3.3.2 Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em <i>Rhodnius prolixus</i> _____	24
4 RESULTADOS _____	26
4.1 Avaliação do efeito da densidade _____	26
4.2 Avaliação do efeito da iluminação _____	28
4.3 Agregação em abrigos e o potencial efeito das fezes _____	29
4.4 Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em <i>Rhodnius prolixus</i> _____	32
5 DISCUSSÃO _____	33
6 CONCLUSÕES _____	38
REFERÊNCIAS _____	39
APÊNDICE _____	44
APÊNDICE 1 - Script: Avaliação do efeito da densidade _____	44
APÊNDICE 2 - Script: Avaliação do efeito da luminosidade _____	47
APÊNDICE 3 - Script: Agregação em abrigos e o potencial efeito das fezes ____	50
APÊNDICE 4 - Script: Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em <i>Rhodnius prolixus</i> _____	55

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae (subfamília Triatominae) que apresentam grande importância médica por serem vetores do parasito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2002). Estima-se que na região latino-americana cerca de 100 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção, oito milhões encontram-se infectadas com *T. cruzi* e 56 mil novos casos ocorram anualmente. Devido a este quadro epidemiológico, a doença de Chagas causa cerca de 12 mil mortes por ano no continente americano (PAHO, 2012).

Estes insetos vetores adquirem *T. cruzi* quando se alimentam de um mamífero infectado. Uma vez dentro do tubo digestivo do inseto, os parasitos se dividem, colonizam o intestino e a ampola retal e, eventualmente são liberados junto com as fezes. É importante mencionar que estas formas infectantes são frequentemente liberadas durante o repasto sanguíneo quando há dejeção sobre a pele do hospedeiro, neste caso o inseto infectado deposita *T. cruzi* junto com as fezes perto do local da picada. Quando o hospedeiro coça o local pode introduzir involuntariamente os parasitos na circulação, caracterizando assim a transmissão vetorial da doença (Clayton, 2010; WHO, 2002).

A transmissão vetorial é a principal forma de contaminação da doença de Chagas sendo responsável por mais de 80% das novas infecções em áreas endêmicas (Schofield, 1994; Abad-Franch e Aguilar, 2003). Portanto, o controle vetorial apresenta-se como a metodologia central para a prevenção da doença humana. Cabe salientar que um adequado desenho das campanhas de controle depende do entendimento da biologia dos triatomíneos, que representam o foco principal dessas ações.

Os triatomíneos do gênero *Rhodnius* encontram-se distribuídos em 28 províncias biogeográficas desde a América Central até o sul do Brasil, representando ao todo 16 espécies dentre as mais de 140 já descritas para esta subfamília (Abad-Franch e Monteiro, 2007; Schofield e Galvão, 2009). Populações silvestres deste gênero ocupam ecótopos arbóreos associadas principalmente com palmeiras (Abad-Franch et al. 2009). No entanto, triatomíneos adultos invadem

recorrentemente os domicílios, gerando risco de transmissão da doença e, ocasionalmente no caso de algumas espécies, originando novas colônias (Miles et al. 2003). Em muitos casos exitosos, os programas de controle basearam-se na borrifação dos domicílios, utilizando inseticidas de efeito residual, e tiveram como foco as populações sinantrópicas de triatomíneos (Hashimoto e Schofield, 2012). No entanto, a eficácia das ações dos programas de controle vetorial tem sido limitada em diferentes regiões da América Latina, muitas vezes devido à presença de populações silvestres de várias espécies do gênero *Rhodnius* que ocasionalmente habitam ambientes domésticos e peridomésticos (Gurgel-Gonçalves et al. 2008).

Rhodnius prolixus é uma das espécies de triatomíneos vetores mais importantes em termos epidemiológicos, uma vez que populações domésticas são reportadas em grandes áreas da Venezuela e da Colômbia (Guhl, 2007); e já foi considerado o principal vetor do *T. cruzi* na América Central (Hashimoto e Schofield, 2012). Fitzpatrick e colaboradores (2008) mostraram que as infestações domésticas por *R. prolixus* persistiram apesar das medidas de controle do vetor. A colonização recorrente dos domicílios por indivíduos vindos de populações silvestres provavelmente possa explicar as dificuldades no controle desta espécie (Guhl et al. 2009).

Rhodnius robustus faz parte do mesmo complexo de espécies que *R. prolixus* e é uma espécie considerada críptica devido à sua similaridade morfológica com *R. prolixus*. Apesar disso, estudos moleculares têm confirmado que *R. prolixus* é um taxon válido e que *R. robustus* é um complexo de espécies crípticas (Pavan e Monteiro, 2007). Esta espécie tem sido reportada no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela (Galvão, 2014). As diferentes linhagens de *R. robustus* encontram-se distribuídas em toda a região amazônica sendo principalmente silvestres, embora ocasionalmente invada habitações humanas (Abad-Franch et al. 2013a, Abad-Franch et al 2013b).

Rhodnius neglectus, que também faz parte do mesmo complexo de espécies que *R. prolixus*, apresenta distribuição geográfica muito ampla no Brasil, ocorrendo em 13 estados: Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins (Galvão, 2014). Apesar de ser uma espécie predominantemente silvestre, já foi

relatada invadindo, e esporadicamente colonizando, ambientes domiciliares (Gurgel-Gonçalves et al. 2008).

Finalmente, *Rhodnius ecuadoriensis* é considerado um importante vetor da doença de Chagas em várias províncias do Equador e no Norte do Peru, sendo reportado em ambientes intradomiciliares, peridomiciliares e silvestres (Villacís et al. 2010). Na região central do litoral do Equador, as populações silvestres desta espécie encontram-se associadas à palmeira *Phytelephas aequatorialis*; porém, nos vales interandinos do Sul do país, onde a vegetação muda para bosque seco e não existem palmeiras, *R. ecuadoriensis* tem sido relatado em associação com ninhos de esquilos encontrados principalmente na árvore *Acacia macracantha* (Grijalva e Villacís, 2009; Villacís AG, comunicação pessoal). Apesar disso, não existem estudos suficientes para medir o impacto real que essas populações silvestres representam na colonização de ambientes humanos e na transmissão da doença. Guhl (2007) sugere que as considerações de risco epidemiológico desta espécie podem ser equiparadas àquelas já descritas para populações silvestres de *R. prolixus*.

Os triatomíneos são insetos de hábitos noturnos e durante o dia são usualmente encontrados imóveis (acinese) em lugares ocultos e protegidos, agregados com outros membros da população em estreito contato com o substrato, i.e., apresentam tigmotaxia positiva (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Estes insetos tornam-se ativos durante a noite, com dois períodos de máxima atividade, um nas primeiras horas após o anoitecer e outro mais curto durante o amanhecer (Lazzari, 1992). No primeiro período os insetos que se encontram em jejum procuram por fontes de alimento e, no segundo, tentam encontrar um abrigo para passar o dia seguinte (Lorenzo e Lazzari, 1998). Mesmo que existem poucas evidências experimentais, considera-se que outras atividades, tais como o acasalamento, oviposição e dispersão também sejam realizadas durante o início da fase noturna (Lazzari e Lorenzo, 2009).

Após colonizar um novo habitat, os triatomíneos devem encontrar refúgios que ofereçam condições apropriadas, evitando o contato com a luz. Esse processo é mediado pela sua intensa fototaxia negativa (Reisenman et al. 1998). Assim, estes esconderijos garantem que os insetos fiquem protegidos de potenciais predadores. A escolha do abrigo tem significado biológico importante por ser o lugar que estes

insetos irão se esconder, mudar e realizar suas posturas. Além disso, o refúgio facilita interações entre coespecíficos, induzindo o contato com potenciais parceiros sexuais e a obtenção de simbiontes (Lazzari et al. 2013).

As propriedades físicas dos abrigos são relevantes para a sua seleção; refúgios estreitos que oferecem um contato físico intenso parecem ser preferidos pelos triatomíneos (Lazzari e Lorenzo, 2009). O microclima no interior do abrigo também afeta sua escolha; estes insetos expressam uma clara preferência na seleção por locais com condições de temperatura e umidade relativa adequadas (Lorenzo e Lazzari, 1999). Por outro lado, é importante destacar que os triatomíneos parecem exibir padrões espécie-específicos de exploração dos abrigos. Fatores como a densidade de insetos e a iluminação ambiental podem afetar diferencialmente o uso do refúgio, fatos que revelam a existência de variações na intensidade das respostas tigmotáticas e fototáticas que parecem ser particulares de cada espécie (Mota e Lorenzo, 2012). Pavan e colaboradores (2016) sugeriram que a resposta fototática depende também do estágio ninfal e que os padrões de atividade locomotora diária podem variar inclusive em espécies pertencentes a um mesmo complexo. Estas diferenças comportamentais entre espécies podem ter um grande impacto sobre a sua capacidade de domiciliação e, portanto, sobre sua importância vetorial.

Como já mencionado, os triatomíneos evitam espontaneamente os ambientes iluminados, sendo que os fatores que afetam a expressão da fototaxia negativa são tanto de origem endógena, quanto exógena. Insetos treinados em ciclos de luz/escuridão (12/12 LE) que foram expostos subsequentemente à iluminação ou escuridão permanentes, apresentaram as mesmas respostas fototáticas que insetos mantidos em ciclos 12/12 LE. Esses fatos indicam que a fototaxia negativa não depende unicamente das informações vindas do ambiente, mas que tem um controle endógeno (Reisenman et al. 1998).

O comportamento de agregação de triatomíneos é, em parte, mediado por sinais químicos (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Estudos realizados em diversas espécies têm demonstrado a existência de agregação diante de compostos voláteis emitidos pelas suas fezes (Schofield e Patterson, 1987; Cruz-López et al. 1993; Lorenzo Figueiras et al. 1994; Lorenzo e Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2002; Vitta et al. 2002; Pires et al. 2002; Vitta et al. 2007). Originalmente, foi

sugerido que estes sinais químicos desempenhavam um papel na identificação das fontes de alimento dos insetos (Schofield e Patterson, 1977). Porém, Lorenzo e Lazzari (1996) identificaram um padrão de distribuição de fezes em relação aos abrigos sugerindo que as fezes teriam uma função comunicacional diferente da originalmente proposta. Isto é, que o sinal das fezes não somente induz agregação, mas atua como uma marca química que permite o reconhecimento dos abrigos e a orientação dos insetos até os mesmos. De fato, a preferência por refúgios marcados com fezes atrai os insetos para locais onde seus coespecíficos, parceiros sexuais e simbiontes estão disponíveis, além de fornecer condições ideais para proteção e, portanto, para a colonização de um determinado habitat.

A resposta dos triatomíneos ao sinal de agregação fecal pode variar de acordo com diversos fatores, por exemplo, mudanças em suas respostas aos sinais de agregação fecais em função do seu estado nutricional (Schofield e Patterson, 1977; Ondarza et al. 1986; Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2000). Especificamente, observou-se que indivíduos recentemente alimentados não apresentam respostas diante do sinal até 8-10 horas após a alimentação (Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2000). Por outro lado, demonstrou-se para *Triatoma infestans* que apenas as fezes secas promovem agregação, enquanto fezes frescas induzem sua rejeição (Lorenzo Figueiras et al. 1994). As fezes dessa espécie tornam-se atraentes somente três horas depois de terem sido depositadas, e podem atrair os insetos por até 10 dias (Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2000). Este período de tempo parece ser suficientemente longo para minimizar os esforços de manutenção, mas curto o suficiente para assegurar que os abrigos abandonados deixem de atrair novos indivíduos (Lazzari et al. 2013). É importante destacar que o sinal de agregação das fezes é volátil e, por tanto, pode atuar à distância e ser transportado através de correntes de ar (Lorenzo Figueiras et al. 1994).

Um segundo fator químico de agregação denominado pegadas (do inglês *footprints*) foi identificado para estes insetos. Este sinal está presente na cutícula dos triatomíneos e é transferido para o substrato pelo contato físico das pernas e o corpo dos insetos. É importante destacar que os *footprints* são capazes de promover a agregação somente através de contato (Lorenzo Figueiras e Lazzari, 1998; Pires et al. 2002; Vitta et al. 2002; Vitta et al. 2007).

A existência de respostas interespecíficas aos sinais de agregação tem sido descrita para as fezes e os *footprints* de várias espécies de triatomíneos (Cruz-López et al. 1993; Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2002; Pires et al. 2002). Lorenzo Figueiras e Lazzari (2002) mostraram que substâncias presentes nas fezes de *R. prolixus* geram respostas de agregação em *T. infestans*, no entanto, as fezes de *T. infestans* não foram capazes de induzir a agregação de *R. prolixus*.

Estudos realizados sobre o comportamento de agregação de triatomíneos têm demonstrado que os compostos ativos das fezes e das *footprints* têm identidades diferentes. Por um lado, as *footprints* podem ser extraídas por solventes não polares (Lorenzo Figueiras e Lazzari, 1998), enquanto que os compostos ativos das fezes eluem-se em solventes polares (Cruz-López e Morgan, 1995). Os sinais fecais são capazes de atrair insetos quando adicionados a uma corrente de ar, ou seja, envolvem quimiorrecepção olfativa por serem voláteis; enquanto as *footprints* exigem o contato físico dos insetos com as superfícies marcadas, indicando que se trate de um processo de quimiorrecepção por contato (Pires et al. 2002).

Cruz-López e Morgan (1995) analisaram a natureza química do sinal de agregação das fezes de triatomíneos e identificaram quatro substâncias: o-aminoacetofenona, 4-metilquinazolina, 2,4-dimetilquinazolina e 2-pirrolidinona. Quando testadas em concentrações entre 0,1 e 100 ng, nenhum dos compostos foi consistentemente atraente para os insetos (Cruz-López e Morgan, 1995). Papéis de filtro impregnados com fezes de triatomíneos e posteriormente umidificados liberam amônia e, a sua utilização em ensaios mostrou que este composto é capaz de atrair ninfas (Taneja e Guerin, 1997). Porém, quando testada em associação com abrigos, a amônia mostrou-se incapaz de induzir a sua escolha (Lorenzo MG, comunicação pessoal), sugerindo que a atração observada por Taneja e Guerin (1997) possa ter relação com a busca do hospedeiro, uma vez que esse composto é comumente emitido por hospedeiros e diversos insetos hematófagos o utilizam para encontrar fontes de alimento.

Levando em consideração que os sinais presentes nas fezes promovem agregação interespecífica entre a maioria das espécies estudadas, Mota e colaboradores (2014) identificaram compostos comuns (acetamida, 2,3-butanodiol e os ácidos acético, 3-metilbutírico e hexanóico) nas fezes de três espécies de triatomíneos. Estes autores evidenciaram que uma mistura sintética destes

compostos é capaz de recrutar ativamente insetos das três espécies no interior de abrigos. Esta mistura poderia ser utilizada para o desenvolvimento de iscas que contribuam para a detecção precoce de processos de infestação ou reinfestação domiciliar de triatomíneos. Resta ainda determinar se a mistura química indutora de agregação tem potencial para promover esse comportamento em outros vetores de importância epidemiológica, como por exemplo, *Rhodnius prolixus*.

Sem uma vacina ou tratamento específico disponível para as grandes intervenções de saúde pública, as estratégias de controle da doença de Chagas baseiam-se na prevenção da transmissão, principalmente por meio da eliminação de vetores domiciliados (Dias, 2011). Neste contexto, um melhor conhecimento do comportamento de cada uma das espécies com importância epidemiológica é essencial para o desenho de novas ferramentas e estratégias de controle vetorial, já que o uso prolongado e indiscriminado de produtos químicos xenobióticos tem provocado o aparecimento de populações resistentes a inseticidas em várias espécies de triatomíneos (Mougabure-Cueto e Picollo, 2015).

No presente trabalho caracterizamos alguns dos fatores relacionados com a escolha de abrigos e o uso de sinais de agregação em quatro espécies do gênero *Rhodnius*. Para isso, foi avaliado o efeito da densidade de insetos e da iluminação na tendência a escolher refúgios em *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus*. Adicionalmente, testamos a capacidade das fezes para promover a escolha do abrigo nas mesmas espécies e em *R. ecuadoriensis*. Finalmente, avaliamos se a mistura sintética publicada por Mota et al. (2014) é capaz de induzir a escolha de abrigos em *R. prolixus*, assim como acontece com as espécies de triatomíneos previamente estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar aspectos relevantes que afetam o uso de abrigos em espécies do gênero *Rhodnius*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da densidade de triatomíneos do gênero *Rhodnius* na tendência em permanecer em abrigos.
- Avaliar a influência da fototaxia negativa em espécies do gênero *Rhodnius* sobre tendência a entrar em abrigos.
- Avaliar se as fezes de espécies do gênero *Rhodnius* agem como marcas químicas do abrigo.
- Avaliar a preferência de *R. prolixus* por abrigos artificiais impregnados com mistura sintética de odores de fezes de triatomíneos.

3 METODOLOGIA

3.1 Manutenção e padronização dos insetos

Os insetos utilizados nos experimentos foram criados no insetário do grupo de Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos do CPqRR. As colônias foram mantidas em sala climatizada com temperatura em torno de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotoperíodo natural. Para sua manutenção, os insetos foram alimentados em um alimentador artificial com sangue de coelho citratado.

Todos os experimentos foram realizados com insetos padronizados: ninfas de 5º estágio com 12 ± 2 dias de jejum pós-ecdise. O fotoperíodo (12 horas luz/12 horas escuridão) em que os insetos eram mantidos foi padronizado 72 horas antes de cada ensaio.

3.2 Efeito da densidade de insetos e da iluminação sobre o uso de abrigos

3.2.1 Avaliação do efeito da densidade

O efeito da densidade sobre a tendência a entrar em abrigos foi avaliado em *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*. Para isso, foi analisada a proporção destes insetos fora do abrigo quando expostos a diferentes níveis de densidade de indivíduos. Foram utilizados grupos de 20, 40, 60, 80, e 100 triatomíneos de 5º estágio de cada espécie.

Os experimentos foram realizados em arenas de acrílico quadradas (1x1 m) com fundo forrado utilizando papel Kraft como substrato. Cada arena continha, no centro, um abrigo artificial feito de pedaço de papelão corrugado (20x10 cm) e dobrado ao meio para gerar duas fendas laterais que permitiam a entrada dos insetos.

Cada grupo de insetos foi liberado no centro da arena duas horas antes do início da escotofase no ciclo artificial em que foram treinados e permaneceram três

noites com ciclo de iluminação artificial de 12:12 L/E. O abrigo foi removido da arena duas horas após o início da terceira fotofase. Por fim, foi registrado o número de insetos encontrados dentro e fora do refúgio. Todos os testes foram conduzidos em uma sala com temperatura controlada ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$). Para cada densidade testada foram realizadas três repetições.

Para determinar se houve efeito significativo da densidade (20, 40, 60, 80 e 100) sobre a proporção de insetos encontrados fora do abrigo foi utilizado um modelo GLM (*Generalized Linear Model*) com distribuição binomial para cada espécie. Nas espécies em que foi comprovado um efeito da densidade, ou seja, quando a proporção de insetos fora do abrigo variou significativamente em função da densidade, realizou-se um teste de Tukey para verificar diferenças par a par entre as densidades testadas.

3.2.2 Avaliação do efeito da iluminação

Foi avaliado o efeito da presença de um ciclo de luz sobre a tendência de *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus* a entrar em abrigos. Para isso, o número médio de triatomíneos fora do abrigo foi comparado entre triatomíneos expostos a um ciclo de luz/escuridão (12/12 LE) e triatomíneos expostos a escuridão permanente.

Foram utilizados grupos de 40 ninfas de 5º estágio de cada uma das espécies. Os insetos foram liberados duas horas antes do início da escotofase no centro de uma arena de acrílico quadrada, como descrita anteriormente para os ensaios de efeito da densidade (item 3.2.1). As ninfas permaneceram no local expostas a escuridão permanente durante três noites. No quarto dia, o abrigo foi removido da arena duas horas após o virtual início da fotofase com subsequente registro do número de insetos dentro e fora do refúgio.

Os resultados destes ensaios foram comparados com aqueles obtidos no experimento que testou o efeito da densidade utilizando 40 insetos expostos à ciclo de iluminação. Todos os testes foram conduzidos em sala com temperatura controlada. Para cada condição de iluminação foram realizadas três repetições.

Para comparar o número de insetos fora do abrigo de acordo com a condição de luminosidade (12/12 LE ou escuridão completa) foi feito inicialmente, para cada espécie, o teste de normalidade (Shapiro-Wilks) cujo objetivo foi definir o tipo de teste a ser utilizado posteriormente. Em todas as espécies utilizou-se o teste *t* de Student para amostras independentes para a comparação.

O número de insetos fora do abrigo foi comparado para cada condição de iluminação testada em função da espécie (*R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*). Depois de realizado o teste de normalidade, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em ambas as condições.

3.3 A escolha de abrigos e o uso de marcas químicas de agregação em espécies do gênero *Rhodnius*.

3.3.1 Agregação em abrigos e o efeito potencial das fezes

Ensaio de dupla escolha foram utilizados para avaliar a preferência entre abrigos limpos e abrigos associados com fezes de coespecíficos. A escolha foi avaliada separadamente em *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. ecuadoriensis*. Para obtenção das fezes utilizadas como estímulo, grupos de insetos de cada uma das espécies foram alimentados (separadamente por espécie) utilizando um recipiente plástico com fundo fechado com uma malha de aço inoxidável sob a qual foram colocados pedaços de papel de filtro (4x6 cm) para coleta das fezes. Este método permitiu evitar que os insetos entrassem em contato com o papel de filtro, obtendo-se somente compostos presentes nas fezes (Lorenzo-Figueiras e Lazzari, 1998). Após 90 minutos, os papéis foram recolhidos para utilização nos testes entre 24 e 72 horas depois. Adicionalmente, no caso de *R. prolixus*, foi avaliada a resposta às fezes dos seus coespecíficos coletadas sem urina. Para tal fim, a recolheção das dejeções somente teve início 24 horas após a alimentação dos insetos e durante um período de 72 horas. Finalmente os papéis foram recolhidos e usados nos testes 8 horas depois.

Os ensaios foram realizados em arenas de acrílico quadradas (anteriormente descritas). Cada arena apresentou dois abrigos feitos de um pedaço de papelão corrugado (20x10 cm) dobrado ao meio para gerar duas fendas laterais que permitiram a entrada dos insetos. Um dos abrigos conteve um pedaço de papel de filtro com fezes secas e o outro um papel limpo (controle). Os abrigos foram oferecidos em lados opostos da arena e afastados 10 cm das bordas opostas.

Foram utilizados grupos de 30 indivíduos de 5^o estágio com 12±2 dias de jejum pós-ecdise. Para iniciar os testes, os insetos foram liberados no meio da arena duas horas antes do início da escotofase do ciclo artificial de iluminação para o qual foram treinados previamente (início da escotofase: 20:00 pm, início da fotofase: 8:00 am). O número de insetos encontrados nos diferentes abrigos foi registrado duas horas depois de finalizada a escotofase, assim como o de insetos fora dos refúgios.

Para cada um dos bancos de dados obtidos das diferentes séries experimentais, utilizou-se um modelo GLM para dados de contagem com distribuição de Poisson, onde os dados dos abrigos controle e estímulo foram considerados. Com isso, verificou-se o efeito dos abrigos testados sobre a escolha que fizeram os insetos.

3.3.2 Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em *Rhodnius prolixus*

O potencial efeito da mistura sintética descrita por Mota *et al.* (2014) sobre a escolha de abrigos foi avaliado em *R. prolixus*. As substâncias utilizadas foram a acetamida, o 2,3-butanodiol e os ácidos acético, 3-metilbutírico e hexanóico. As soluções de 2,3-butanodiol e dos ácidos acético, hexanóico e 3-metilbutírico foram preparadas em diclorometano, enquanto a de acetamida foi preparada em água destilada.

Foram avaliadas quatro doses crescentes da mistura das cinco substâncias químicas: 16 ng, 160 ng, 1,6 µg e 16 µg de cada composto. Para impregnar o papel de filtro (4x6 cm) com estas, foram aplicados com micropipeta, nos lados opostos, 20 µl da solução quaternária de 2,3-butanodiol e dos ácidos: acético, hexanóico e 3-

metilbutírico e 20 μ l da solução de acetamida. Os testes foram realizados seguindo o desenho experimental dos ensaios de agregação em abrigos para avaliar o potencial efeito das fezes. Para avaliar a resposta de *R. prolixus* à mistura sintética, um abrigo apresentou o pedaço de papel impregnado com os compostos previamente descritos e o outro (controle) foi impregnado com os solventes utilizados (diclorometano e água). Para iniciar os testes, grupos de 30 indivíduos de 5º estágio foram liberados no centro da arena duas horas antes do início da escotofase. A escolha dos insetos foi registrada duas horas depois de finalizada a escotofase, contando o número de insetos dentro de cada refúgio e fora dos mesmos. Os experimentos foram conduzidos em sala com temperatura controlada e foram realizadas dez repetições dos ensaios.

Finalmente, utilizando um GLM para dados de contagem com distribuição de Poisson, nós avaliamos o efeito do tipo de abrigo e das diferentes doses sobre a escolha dos insetos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito da densidade

O efeito da densidade de insetos sobre a tendência a entrar em abrigos foi avaliado em *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*. Para isso, foi analisada a proporção de insetos fora do abrigo quando expostos a diferentes níveis deste parâmetro. A figura 1 mostra a proporção média de ninfas encontradas fora do refúgio em cada condição. O modelo GLM binomial mostrou que não existiu um efeito da densidade para *R. prolixus* ($p= 0.073$). No entanto, para *R. neglectus* ($p<0.01$) e *R. robustus* ($p<0.01$) foi evidenciado um efeito da densidade sobre o uso do abrigo, ou seja, a proporção de insetos fora do mesmo foi afetada pela densidade. Para verificar quais níveis de densidade geraram esse efeito para *R. neglectus* e *R. robustus*, realizou-se uma comparação par a par entre as densidades testadas. A tabela 1 mostra que somente os grupos com 100 insetos diferiram daqueles avaliados nas demais condições em ambas as espécies.

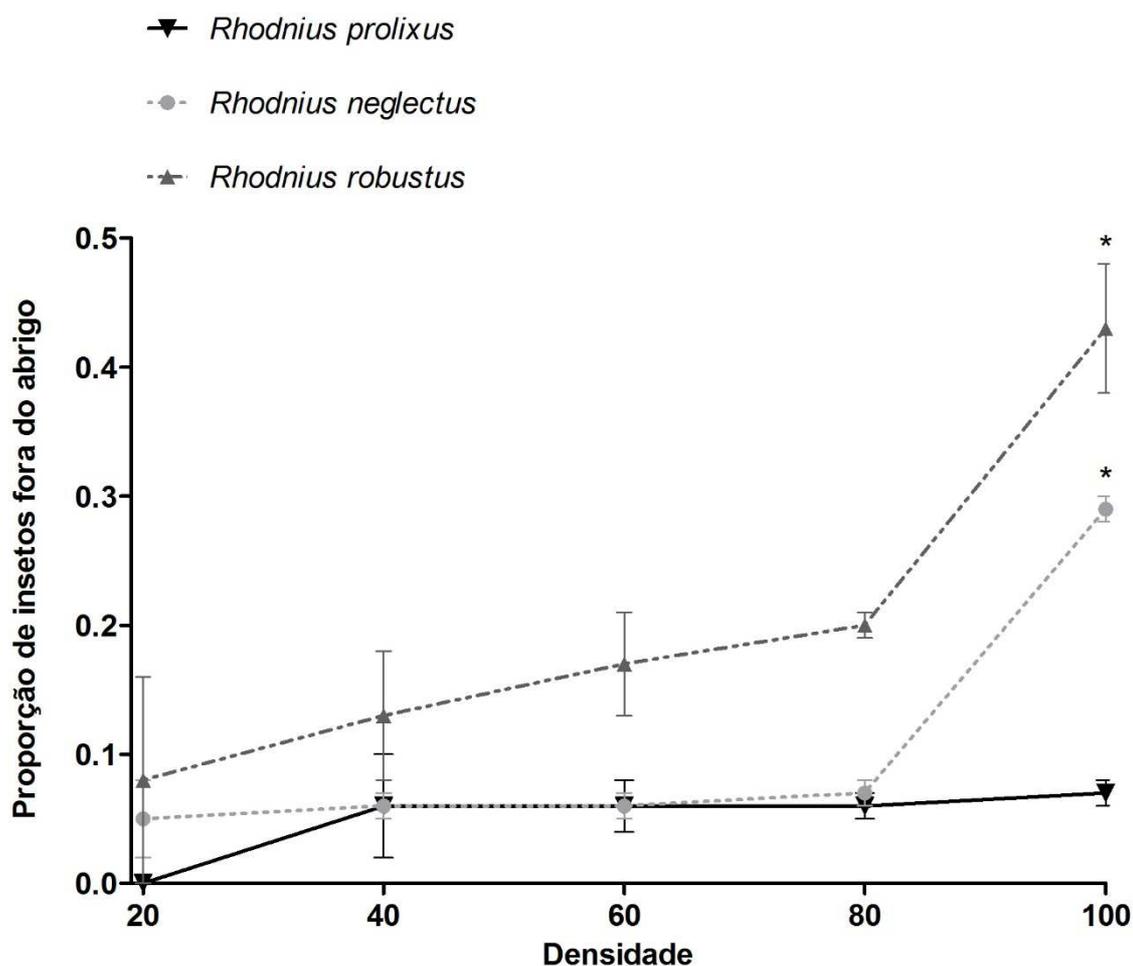


Figura 1. Efeito da densidade. Proporção média de ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* encontrada fora do abrigo.

Tabela 1. Valores de p (teste de Tukey) para comparações par a par entre os resultados das diferentes densidades testadas para *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*.

Densidades	<i>Rhodnius neglectus</i>	<i>Rhodnius robustus</i>
20-100	0.005	<0.01
40-100	<0.01	<0.01
60-100	<0.01	<0.01
80-100	<0.01	<0.01

4.2 Avaliação do efeito da iluminação

O efeito de um ciclo de iluminação sobre a tendência a entrar em abrigos foi avaliado em *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*. A figura 2 mostra o número médio de ninfas encontradas fora do refúgio sob ciclo de luz/escuridão (12/12 LE) ou escuridão completa. Não foram evidenciadas diferenças no número médio de insetos encontrados fora do abrigo entre as duas condições para *R. prolixus* (T de student, $p=1$) e *R. neglectus* (T de student, $p=0.101$). No caso de *R. robustus*, o número médio de ninfas fora do abrigo sob escuridão permanente foi significativamente maior de que sob ciclo de luz/escuridão (T de student, $p=0.009$).

O número de insetos fora do refúgio sob ciclo de luz/escuridão não apresentou diferenças significativas entre *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus* (Kruskal-Wallis, $p=0.229$). Quando analisados os dados dos insetos sob escuridão permanente também não houve diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $p=0.05$), apesar de parecer haver uma tendência ao aumento para *R. robustus*.

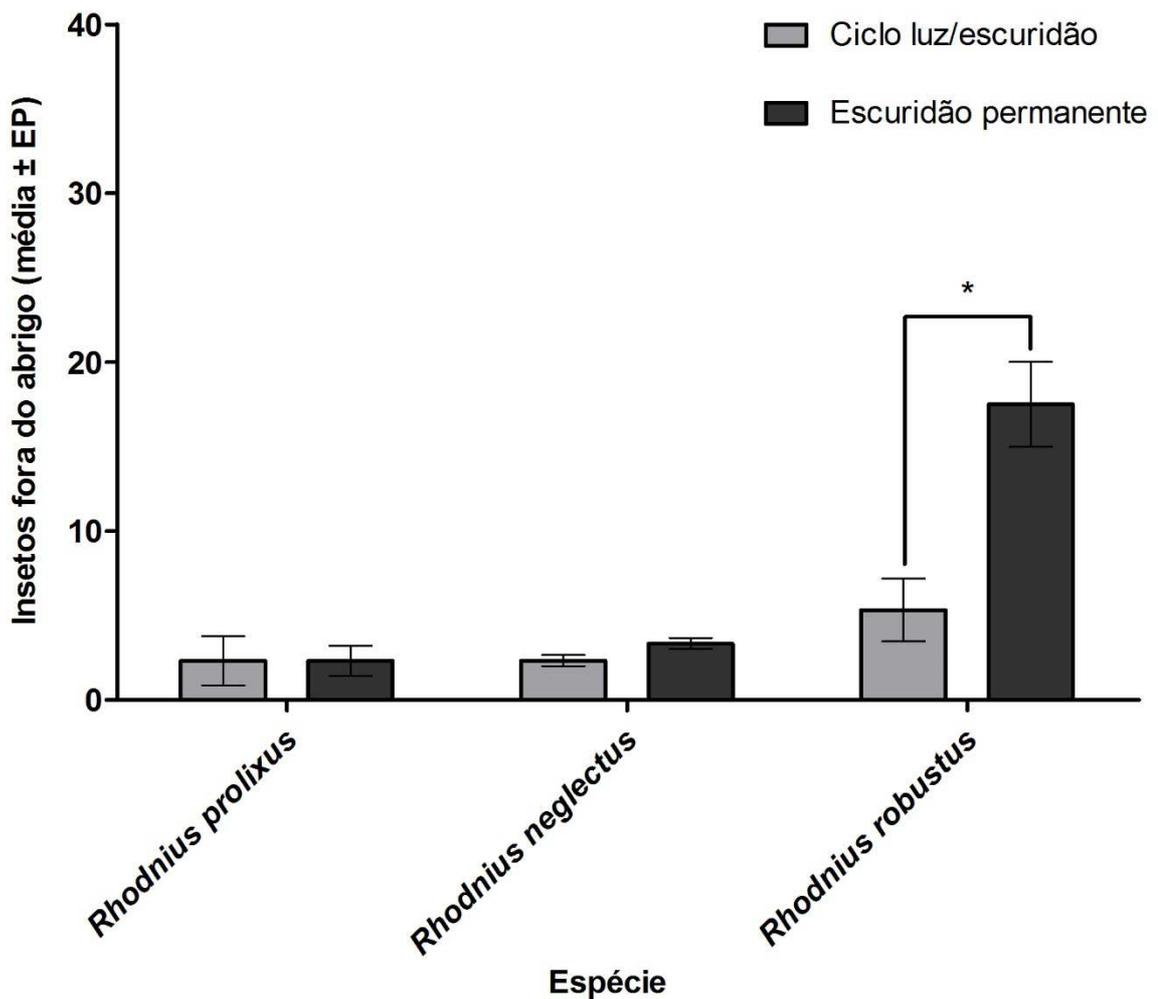


Figura 2. Efeito do ciclo de iluminação. Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* encontradas fora do abrigo sob ciclo de luz/escuridão (12/12 LE) ou escuridão completa. As barras representam os erros padrão das médias.

4.3 Agregação em abrigos e o potencial efeito das fezes

Ensaio de dupla escolha foram utilizados para avaliar a preferência entre abrigos limpos e abrigos associados com fezes de coespecíficos em quatro espécies do gênero *Rhodnius*. A figura 3 mostra o número médio de ninfas encontradas dentro dos abrigos experimentais (fezes) e controle. O modelo GLM de Poisson mostrou que não houve efeito significativo na escolha dos insetos, isto é, os refúgios

associados às fezes não foram escolhidos por nenhuma das espécies quando comparados com os controles (Apêndice 3).

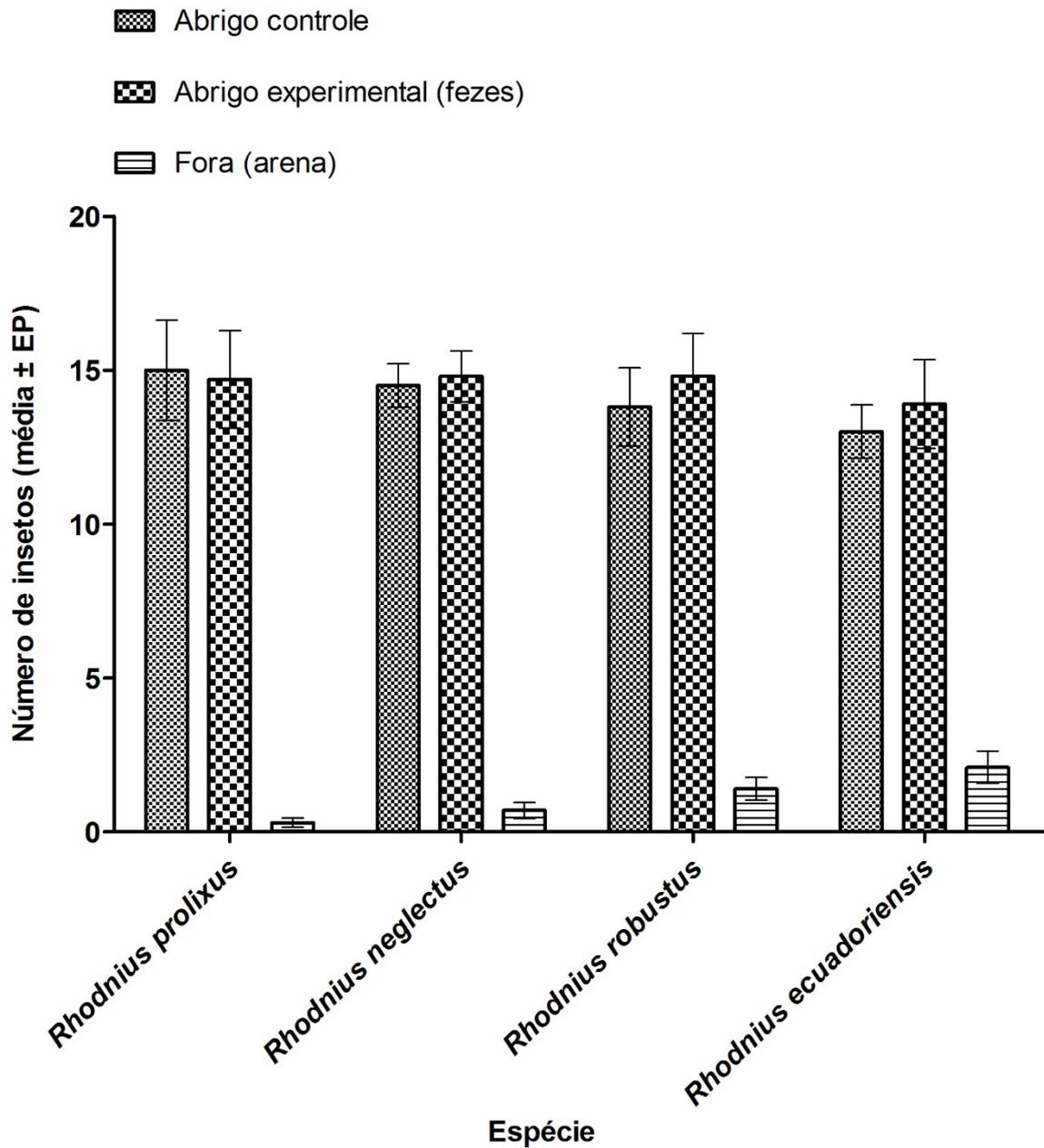


Figura 3. Agregação em abrigos e o efeito potencial das fezes. Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius ecuadoriensis* encontradas dentro dos abrigos experimentais (fezes) e controle. As barras representam os erros padrão das médias.

A figura 4 mostra o número médio de ninfas de *R. prolixus* encontradas dentro dos abrigos experimentais (fezes com ou sem urina) e correspondentes abrigos controle. De maneira semelhante ao observado no experimento anterior, o modelo GLM de Poisson mostrou que não houve efeito significativo na escolha, assim, os abrigos associados às fezes de coespecíficos sem urina também não se mostraram atraentes (Apêndice 3).

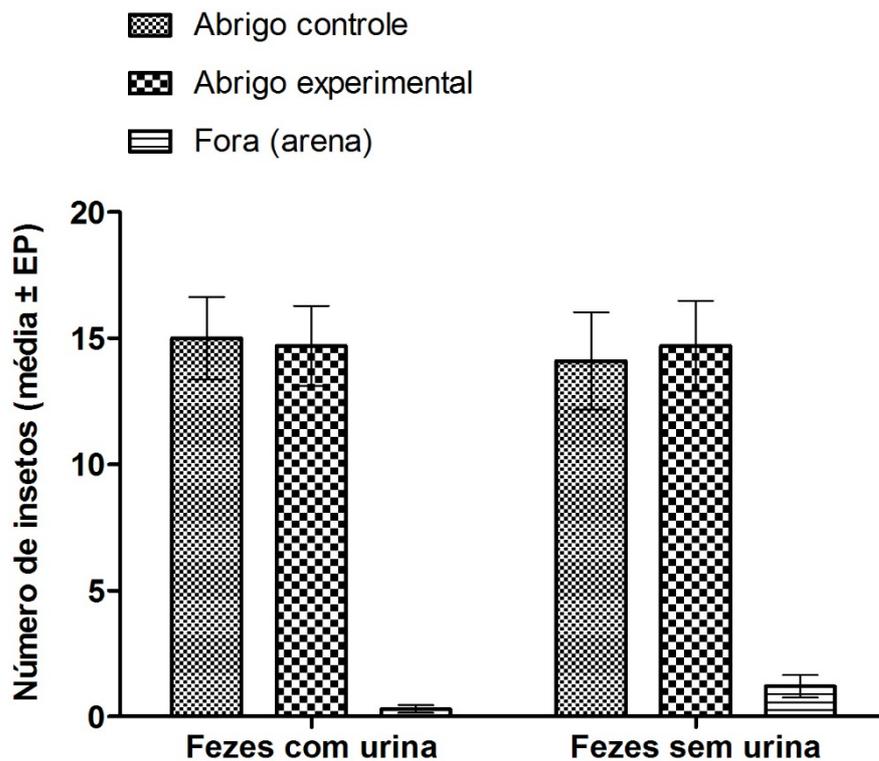


Figura 4. Agregação em abrigos associados a fezes com ou sem urina. Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus* encontradas dentro dos abrigos experimentais (fezes com ou sem urina) e controle. As barras representam os erros padrão das médias.

4.4 Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em *Rhodnius prolixus*

A figura 5 mostra o número médio de ninfas de *R. prolixus* encontradas dentro dos abrigos experimentais (mistura química) e controle. O modelo GLM de Poisson avaliou se houve efeito do tipo de abrigo e das diferentes doses na escolha dos insetos. Os resultados mostraram que nenhum dos fatores avaliados teve efeito significativo na escolha feita pelos insetos (Apêndice 4).

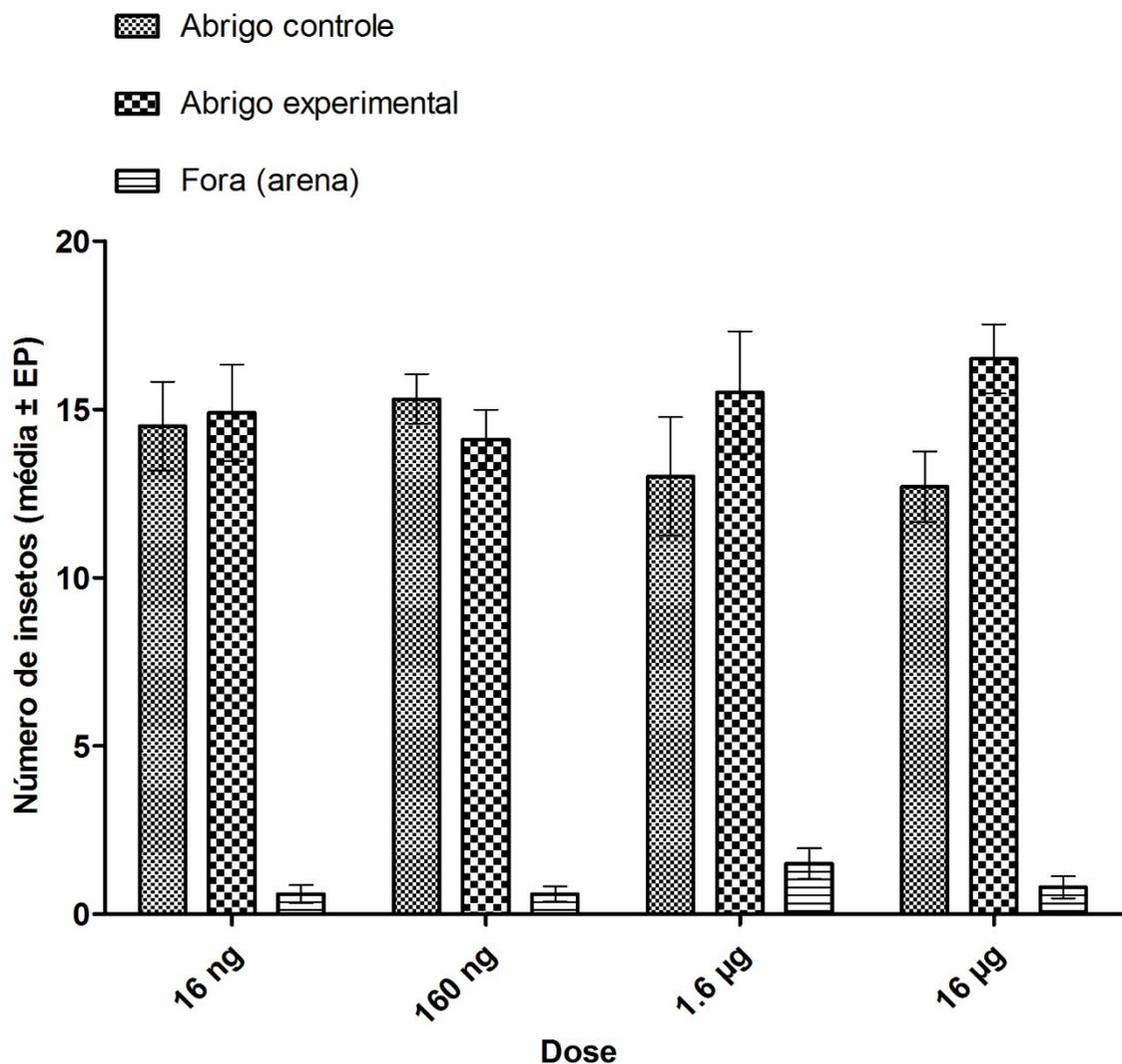


Figura 5. Potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo. Número médio de ninfas de *Rhodnius prolixus* encontradas dentro dos abrigos experimentais (mistura química) e controle. As barras representam os erros padrão das médias.

5 DISCUSSÃO

Aspectos comportamentais e de ecologia sensorial relacionados ao uso de abrigos têm sido estudados para várias espécies de triatomíneos (Lazzari et al. 2013). Assim, esses conhecimentos têm permitido compreender que existem características espécie-específicas no comportamento que afetariam a probabilidade de colonização de ambientes domésticos pelas diversas espécies. Os triatomíneos do gênero *Rhodnius* apresentam grande relevância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas, porém, o estudo do uso de refúgios em insetos deste gênero permanece limitado. No presente trabalho caracterizamos fatores que afetam diferencialmente a decisão de permanecer em abrigos em quatro espécies deste gênero. Para isso, foi avaliado se a densidade e a fototaxia negativa afetam a escolha de refúgios e, subsequentemente, a possibilidade de uso de marcas químicas de agregação, determinando assim que algumas das espécies estudadas apresentam perfis diferenciados com relação ao uso de abrigos.

Ao avaliar o efeito da densidade, observou-se que *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus* reagem de maneira particular na sua tendência a ocupar refúgios, isto é, a quantidade de insetos presentes no ambiente afetou diferencialmente a cada espécie (**Figura 1**). Como demonstrado nos resultados, a proporção de ninfas de *R. prolixus* que permaneceram fora do abrigo foi extremamente baixa independentemente da densidade. No entanto, *R. neglectus* e *R. robustus* sofreram um efeito dependente da densidade, tendendo a permanecer fora dos refúgios em uma maior proporção. Essas diferenças sugerem que apesar dos insetos serem submetidos a condições ambientais aparentemente semelhantes do ponto de vista sensorial, a percepção da situação por estas duas espécies parece distinta quando comparada com a de *R. prolixus*, já que ambas apresentaram menor tendência a entrar em abrigos diante de altas densidades.

É importante ressaltar que tanto para *R. neglectus* quanto para *R. robustus*, evidenciou-se um efeito estatisticamente significativo somente na densidade mais alta avaliada (**Tabela 1**). Embora, essa condição particular indique que foi atingido um limiar de reação a densidade para essas duas espécies, na faixa de densidades avaliadas não foi possível detectá-lo para *R. prolixus*.

Mota e Lorenzo (2012) reportaram o efeito diferencial que altas densidades têm no uso de abrigos em duas espécies de triatomíneos (*P. megistus* e *T. infestans*). Segundo os autores, possíveis variações na intensidade da tigmotaxia entre as espécies poderiam explicar as diferenças da influência da densidade no uso do abrigo. Nossos resultados mostraram que dentre as espécies estudadas, *R. robustus* e *R. prolixus* apresentaram a menor e maior tolerância à densidade, respectivamente. Em *R. neglectus* e *R. robustus*, possivelmente exista um efeito densidade-dependente que compete em termos hierárquicos e se impõe sobre a tigmotaxia positiva. Quando atingida uma alta quantidade de insetos, uma menor proporção de ninfas ocupou o refúgio. Isto parece afetar diferencialmente as espécies estudadas neste trabalho (**Figura 1**). É possível que existam sinais químicos ou de outra modalidade sensorial que antagonizariam a tigmotaxia fazendo que uma maior proporção de ninfas permaneça fora do abrigo. Desse modo, se torna interessante elucidar os fatores que intervêm na decisão individual da entrada e permanência nos abrigos por triatomíneos, em estudos futuros.

Complementarmente, foi evidenciado que a tendência a entrar em abrigos é diferencialmente afetada pela presença de um ciclo de luz nas espécies estudadas (**Figura 2**). A proporção de *R. robustus* que permaneceram fora dos refúgios nas condições testadas sugere que os insetos dessa espécie têm um comportamento particular dentre os representantes do gênero estudado, semelhante ao observado para *T. infestans* (Mota & Lorenzo, 2012). Assim, a fototaxia negativa teria um papel fundamental na motivação para a busca de abrigos nos insetos desta espécie. A fototaxia negativa é uma resposta que se mostra consistente no comportamento dos triatomíneos, estando finamente modulada e demonstrando plasticidade e adaptação (Lazzari et al. 2013). Apesar de *R. prolixus* apresentar uma marcada resposta fototática negativa (Marlière et al. 2015), no presente trabalho, as condições de luz e escuridão não influenciaram na tendência a entrar em abrigos por *R. prolixus* e *R. neglectus*. Poderíamos especular que a forte resposta tigmotática observada nestas duas espécies é o fator essencial na decisão de entrada e permanência em refúgios, uma vez que, mesmo em escuridão permanente os insetos mostraram uma forte preferência por permanecerem em contato físico com outros indivíduos dentro do abrigo.

O abrigo é um recurso avaliado de maneira multimodal pelos triatomíneos e existem características do seu uso e exploração que parecem próprias de cada espécie. Como já mencionado, considera-se que o comportamento de agregação destes insetos é mediado por sinais químicos e tigmotaxia (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Diversos trabalhos mostram a existência de agregação diante de compostos voláteis emitidos pelas fezes de várias espécies. Lorenzo e Lazzari (1996) identificaram que as fezes de *T. infestans* apresentam uma marca química que induz o reconhecimento dos refúgios e sua agregação dentro dos mesmos. A existência de um sinal de agregação nas fezes de *R. prolixus* tem sido reportada por diversos autores utilizando placas de Petri como arenas experimentais (Schofield e Patterson, 1977; Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2002). Adicionalmente, Falvo et al. (2015) caracterizaram o padrão de distribuição de fezes nesta espécie e evidenciaram que *R. prolixus* deposita seus excrementos principalmente dentro dos abrigos. Isto indica, que não marcam as entradas dos mesmos.

Utilizando ensaios de dupla escolha, nossos resultados mostraram que as marcas químicas fecais parecem não ter um papel crucial na escolha de refúgios para insetos do gênero *Rhodnius*. Nenhuma das espécies avaliadas neste trabalho, que representam 25% do gênero, mostrou resposta de agregação em abrigos diante das suas fezes (**Figura 3**). Estes fatos são reforçados pelos resultados obtidos na série experimental que testou refúgios associados a fezes sem urina para *R. prolixus*. O intuito de realizar esse experimento adicional foi avaliar se os insetos poderiam marcar os abrigos somente depois de o processo diurético ter finalizado, pois já tem sido descrito que durante o mesmo os triatomíneos tendem a ficar fora dos abrigos (Lazzari e Lorenzo, 2009). Apesar disso, os insetos tampouco mostraram preferência por abrigos associados com fezes sem urina (**Figura 4**). Portanto, nas espécies do gênero *Rhodnius* a agregação em abrigos parece estar mediada fundamentalmente por fatores físicos e mecânicos, mais do que por fatores químicos.

Os dados reportados na literatura sobre o comportamento de agregação e defecação de *R. prolixus*, corroboram com nossos resultados e demonstram que os sinais químicos das fezes não têm o mesmo significado biológico que para outros triatomíneos (Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2002). Nesse contexto, é importante considerar a ecologia das diferentes espécies de triatomíneos. Os insetos do gênero

Rhodnius estão associados a ninhos de aves e pequenos mamíferos localizados principalmente em palmeiras. Assim seus abrigos poderiam incluir materiais como galhos, folhas ou outros objetos orgânicos e, provavelmente, não possuem acessos definidos. Mantendo um contato tão estreito com seus hospedeiros, estes insetos não precisariam de marcas químicas para retornar aos refúgios. Porém, poderiam utilizar quimiotaxia ou respostas termotáticas positivas para se aproximar das fontes alimentares ou, pelo contrário, termotaxia negativa para se afastar das mesmas e encontrar um local seguro de acordo com a sua avaliação tigmotática (Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2002).

O comportamento de agregação da barata-alemã, *Blattella germanica*, é mediado por dois tipos de sinais químicos: compostos produzidos pelo próprio inseto e compostos das fezes, na sua maioria, ácidos carboxílicos voláteis produzidos pela microbiota intestinal desses insetos (Wada-Katsumata et al. 2015). Esses autores mostraram que as comunidades bacterianas refletem o ambiente onde os insetos se desenvolvem, existindo assim uma plasticidade nos seus feromônios de agregação fecal. Isso faz com que cada colônia tenha odores específicos associados com ela. Considerando que as baratas e os triatomíneos são insetos noturnos que apresentam aspectos da sua biologia muito semelhantes, por exemplo, tendo fototaxia negativa, tigmotaxia positiva, sinais de agregação nas fezes e feromônios de contato cuticulares, poderia se especular que as comunidades bacterianas dos insetos de uma colônia de laboratório possam ser perdidas paulatinamente. Porém, esse não parece ser o caso na literatura prévia para outras espécies de triatomíneos, bem como para *R. prolixus* que responde as suas fezes em ensaios realizados em placas de Petri (Schofield e Patterson, 1977; Cruz-López et al. 1993, Lorenzo Figueiras e Lazzari, 2002).

Como já mencionado, Mota et al. (2014) desenvolveram uma isca química para triatomíneos, que se mostrou capaz de recrutar ativamente insetos de três espécies no interior de abrigos. Esta armadilha é baseada no fato de que os sinais presentes nas fezes promovem agregação interespecífica. Coerentemente com o observado nos ensaios de dupla escolha (abrigos-fezes), a mistura química sintética não foi capaz de induzir a entrada e permanência dos insetos no interior dos refúgios em nenhuma das doses testadas com *R. prolixus* (**Figura 5**). Esses resultados são consistentes com o relatado por Lorenzo Figueiras e Lazzari (2002) que mostraram

que as fezes de *T. infestans* não foram capazes de induzir agregação em *R. prolixus*, apesar de que as substâncias presentes nas fezes de *R. prolixus* geram respostas de agregação em *T. infestans*.

O presente trabalho teve a finalidade de contribuir ao melhor entendimento dos aspectos relacionados com a busca, eleição de abrigos e o uso de sinais de agregação em insetos do gênero *Rhodnius* e em triatomíneos em geral. Foi possível determinar perfis espécie-específicos de exploração de refúgios definidos por fatores tais como a tigmotaxia e fototaxia negativa. Adicionalmente, foi estabelecido que as espécies do gênero *Rhodnius* não parecem utilizar marcas fecais para promover o reconhecimento de abrigos em uso, tal como observado para outros triatomíneos. As diferenças observadas entre as espécies estudadas poderiam gerar um impacto sobre a sua habilidade para colonizar ambientes humanos, onde a capacidade de se esconder e não ser detectados parece ser crítica. Desta maneira, sugere-se que o estudo do uso de abrigos em triatomíneos fornece pistas sobre a facilidade/dificuldade de detecção das diferentes espécies em função da sua maior ou menor tendência a permanecer em abrigos fora do alcance humano, inclusive quando atingidas altas densidades nas colônias.

Nossos dados demonstram que é necessário caracterizar os diversos aspectos do comportamento de diferentes espécies de insetos vetores, evitando as generalizações não baseadas em dados experimentais. Como evidenciado, *R. prolixus* apresentou uma alta tendência a permanecer dentro dos abrigos em todas as condições testadas, fatos que levam a concluir que sua detecção principalmente em ambientes domésticos deve ser extremadamente difícil. Assim, poderia se entender melhor a sua importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas. Finalmente, os resultados do presente estudo indicam que é necessário esclarecer a função do sinal de agregação presente nas fezes de *R. prolixus* para permitir uma melhor compreensão da sua ecologia química, e do seu comportamento em geral, dada sua extrema relevância na transmissão do *T. cruzi* em vastas regiões da América Latina.

6 CONCLUSÕES

Avaliação do efeito da densidade

A proporção de ninfas de *R. prolixus* que permaneceram fora do abrigo foi extremadamente baixa independentemente da densidade.

Uma maior proporção de *R. neglectus* e *R. robustus* tende a permanecer fora dos refúgios diante de altas densidades de coespecíficos.

Avaliação do efeito da iluminação

A fototaxia negativa apresentou um papel fundamental na motivação para a busca de abrigos para *R. robustus*.

Para *R. prolixus* e *R. neglectus* não foram evidenciadas diferenças na tendência a entrar em abrigos entre as condições de iluminação testadas.

Agregação em abrigos e o potencial efeito das fezes

Os sinais químicos das fezes parecem não ter um papel crucial na marcação de refúgios para *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. ecuadoriensis*. É possível que se trate de uma característica geral para insetos do gênero *Rhodnius*, já que a proporção de espécies estudadas no nosso trabalho parece significativa.

Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em *Rhodnius prolixus*

A mistura química sintética não foi capaz de induzir a permanência das ninfas de *R. prolixus* no interior dos refúgios em nenhuma das doses testadas.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; AGUILAR, H. M. Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. Quito. **OPS/OMS Ministerio de Salud Pública**. 2003.

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Hemiptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 57-70, 2007.

ABAD-FRANCH, F. et al. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Tropica**, v. 110, n. 2, p. 159-177, 2009.

ABAD-FRANCH, F. et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 92-99, 2013.

ABAD-FRANCH, F. et al. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 251-254, 2013b.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. n7301_suppl, p. S12-S15, 2010.

CRUZ-LÓPEZ, L.; MALO, E.A.; ROJAS, J.C. Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 535-539, 1993.

CRUZ-LÓPEZ, L.; MORGAN, E.D. Chemical investigation of aggregation behavior of *Triatoma* bugs (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 12, p. 2069, 1995.

DIAS, J.C.P. Os primórdios do controle da doença de Chagas (em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p. 12-18, 2011.

FALVO, M.L.; LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; MANRIQUE, G. Spatio-temporal analysis of the role of faecal depositions in aggregation behaviour of the triatomine *Rhodnius prolixus*. **Physiological Entomology**, v. 41, p. 24-30, 2015.

FITZPATRICK, S. et al. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n 4, p. e210, 2008.

GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. **SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia**, 2014.

GRIJALVA, M. J.; VILLACIS, A. G. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in sylvatic habitats in the southern highlands (Loja Province) of Ecuador. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 708-711, 2003.

GUHL, F. Chagas disease in Andean countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 29-38, 2007.

GUHL, F.; PINTO, N.; AGUILERA, G. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 71-75, 2009.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 90-98, 2008.

HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C.J. Elimination of *Rhodnius prolixus* in central America. **Parasites & vectors**, v. 5, no 1, p. 45, 2012.

LAZZARI, C.R. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, n. 11, p. 895-903, 1992.

LAZZARI, C.R.; FISCHBEIN, D.; INSAUSTI, T.C. Differential control of light–dark adaptation in the ocelli and compound eyes of *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 11, p. 1545-1552, 2011.

LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G. Exploiting triatomine behaviour: alternative perspectives for their control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 65-70, 2009.

LAZZARI, C.R.; PEREIRA, M.H.; LORENZO, M.G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 34-47, 2013.

LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; KENIGSTEN, A.; LAZZARI, C. R. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, n. 4, p. 311-316, 1994.

LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; LAZZARI, C. R. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. **Physiological Entomology**, v. 23, n. 1, p. 33-37, 1998.

LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; LAZZARI, C.R. Temporal change of the aggregation response in *Triatoma infestans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 889-892, 2000.

LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; LAZZARI, C.R. Aggregation behaviour and interspecific responses in *Rhodnius prolixus* Stål. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 569-571, 2002.

LORENZO, M.G.; LAZZARI, C.R. The spatial pattern of defaecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, n. 9, p. 903-907, 1996.

LORENZO, M.G.; LAZZARI, C.R. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 70, n. 2, p. 163-170, 1998.

LORENZO, M.G.; LAZZARI, C.R. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 72, n. 3, p. 241-249, 1999.

MARLIÉRE, N.P. et al. Trypanosomes modify the behavior of their insect hosts: effects on locomotion and on the expression of a related Gene. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, p. e0003973, 2015.

MILES, M.A.; FELICIANGELI, M.D.; DE ARIAS, A.R. American trypanosomiasis (Chaga's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **British Medical Journal**, v. 326, n. 7404, p. 1444, 2003.

MOTA, T.; LORENZO, M.G. Lack of segregation between two species of Chagas disease vectors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 1, p. 109-116, 2012.

MOTA, T. et al. A multi-species bait for Chagas disease vectors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2677, 2014.

MOUGABURE-CUETO, G.; PICOLLO, M.I. Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. **Acta Tropica**, v. 149, p. 70-85, 2015.

ONDARZA, R.N.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, A.; MALO, E.A. Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 3, p. 688-692, 1986.

PAHO. Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas (Trypanosomiasis Americana). Disponible em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=es; 2012.

PAVAN, M.G. et al. *Rhodnius prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae) nymphs show different locomotor patterns on an automated recording system. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 239, 2016.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 6, p. 751-758, 2007.

PIRES, H.H.R, et al. Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. **Acta Tropica**, v. 81, n. 1, p. 47-52, 2002.

REISENMAN, C. E.; LAZZARI, C. R.; GIURFA, M. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 183, n. 4, p. 533-541, 1998.

SCHOFIELD, C.J, et al. Triatominae: biology & control. Eurocommunica Publications, 1994.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2, p. 88-100, 2009.

SCHOFIELD, G. J.; PATTERSON, J. W. Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, vol. 13, no 6, p. 727-734, 1977.

TANEJA, J.; GUERIN, P.M. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 181, n. 1, p. 21-34, 1997.

VILLACÍS, A.G.; GRIJALVA, M.J.; CATALÁ, S.S. Phenotypic variability of *Rhodnius ecuadoriensis* populations at the Ecuadorian central and southern Andean region. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 6, p. 1034-1043, 2010.

VITTA, A.C.R., et al. Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 865-867, 2002.

VITTA, A.N.C., et al. The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 101, n. 2, p. 147-152, 2007.

WADA-KATSUMATA, A., et al. Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 51, p. 15678-15683, 2015.

WHO. World Health Organization. Control of Chagas Disease: Technical Report Series, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - Script: Avaliação do efeito da densidade

```
dados = read.table("~/Desktop/Densidade Rhodnius.txt", header=T)
dados$p = dados$y/dados$Total
require(multcomp)
fora = subset(dados, Abrigo=="fora") #seleciona os dados dos insetos fora do abrigo
```

```
#Efeito da densidade em R. prolixus
Rprolixus = subset(foras, Espécie=="Rprolixus")
respp = cbind(Rprolixus$y, Rprolixus$Total-Rprolixus$y)
modp=glm(respp~Densidade, family=binomial, data=Rprolixus)
summary(modp)
```

```
Call:
glm(formula = respp ~ Densidade, family = binomial, data = Rprolixus)
```

```
Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.8322 -1.1630 -0.2507  0.4958  2.1713
```

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -3.589965   0.505734  -7.099 1.26e-12 ***
Densidade    0.011002   0.006154   1.788  0.0738 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 21.297 on 14 degrees of freedom
Residual deviance: 17.881 on 13 degrees of freedom
AIC: 57.793
```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 5
```

```
#Efeito da densidade em R. neglectus
Rneglectus = subset(for, Espécie=="Rneglectus")
respn = cbind(Rneglectus$y, Rneglectus$Total-Rneglectus$y)
modn = glm(respn~Densidade, family=binomial, data=Rneglectus)
summary(modn)
```

```
Call:
glm(formula = respn ~ Densidade, family = binomial, data = Rneglectus)
```

```
Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.4547  -0.6044   0.5909   1.0376   2.1601
```

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -5.080534   0.512968  -9.904 < 2e-16 ***
Densidade    0.040031   0.005759   6.951 3.62e-12 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 91.004 on 14 degrees of freedom
Residual deviance: 23.999 on 13 degrees of freedom
AIC: 74.547
```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 5
```

```
compn = glht(modn, linfct=mcp(Densidade="Tukey")) # compara entre as densidades
summary(compn)
```

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
```

```
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
```

```
Fit: glm(formula = respn ~ Densidade, family = binomial, data = Rneglectus)
```

```
Linear Hypotheses:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
d20 - d100 == 0 -2.06519   0.60577  -3.409 0.00512 **
d40 - d100 == 0 -1.90223   0.40962  -4.644 < 0.001 ***
d60 - d100 == 0 -1.95396   0.34923  -5.595 < 0.001 ***
d80 - d100 == 0 -1.75981   0.28818  -6.107 < 0.001 ***
d40 - d20 == 0  0.16296   0.70893   0.230 0.99930
d60 - d20 == 0  0.11123   0.67584   0.165 0.99981
d80 - d20 == 0  0.30538   0.64641   0.472 0.98856
d60 - d40 == 0 -0.05174   0.50753  -0.102 0.99997
d80 - d40 == 0  0.14242   0.46762   0.305 0.99789
d80 - d60 == 0  0.19416   0.41575   0.467 0.98904
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

```

#Efeito da densidade em R. robustus
Rrobustus = subset(for, Espécie=="Rrobustus")
respr = cbind(Rrobustus$y, Rrobustus$Total-Rrobustus$y)
modr = glm(respr~Densidade, family=binomial, data=Rrobustus)
summary(modr)

Call:
glm(formula = respr ~ Densidade, family = binomial, data = Rrobustus)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.9290 -1.4607 -0.6193  1.1630  2.7100

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -3.303884   0.322125 -10.257 < 2e-16 ***
Densidade    0.028626   0.003821   7.492 6.78e-14 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 102.695  on 14  degrees of freedom
Residual deviance:  35.266  on 13  degrees of freedom
AIC: 92.384

Number of Fisher Scoring iterations: 4

compr = glht(modr, linfct=mcp(Densidade="Tukey")) # compara entre as densidades
summary(compr)

          Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = respr ~ Densidade, family = binomial, data = Rrobustus)

Linear Hypotheses:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
d20 - d100 == 0  -2.1160     0.4814  -4.395 <0.001 ***
d40 - d100 == 0  -1.5900     0.2928  -5.431 <0.001 ***
d60 - d100 == 0  -1.2881     0.2293  -5.618 <0.001 ***
d80 - d100 == 0  -1.1307     0.2001  -5.649 <0.001 ***
d40 - d20 == 0    0.5261     0.5388   0.976  0.854
d60 - d20 == 0    0.8279     0.5071   1.633  0.452
d80 - d20 == 0    0.9854     0.4946   1.992  0.250
d60 - d40 == 0    0.3018     0.3333   0.906  0.885
d80 - d40 == 0    0.4593     0.3140   1.463  0.563
d80 - d60 == 0    0.1574     0.2558   0.615  0.970
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

APÊNDICE 2 - Script: Avaliação do efeito da luminosidade

```

dados = read.table("~/Desktop/Luminosidade.txt", header=T)
a = subset(dados, Abrigo=="fora")

#Efeito da luminosidade para cada espécie

#Compara os insetos fora do abrigo em L/E ou escuridão completa para R. prolixus
Rprolixus = subset(a, Espécie=="Rprolixus")
shapiro.test(Rprolixus$y) #dados normais
      shapiro-wilk normality test

data:  Rprolixus$y
w = 0.94957, p-value = 0.7368

t.test(y~Luminosidade, data=Rprolixus)
      welch Two sample t-test

data:  y by Luminosidade
t = 0, df = 3.2976, p-value = 1
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -5.143205  5.143205
sample estimates:
mean in group escuro      mean in group luz
      2.333333              2.333333

#Compara os insetos fora do abrigo em L/E ou escuridão completa para R.
neglectus
Rneglectus = subset(a, Espécie=="Rneglectus")
shapiro.test(Rneglectus$y) #dados normais
      shapiro-wilk normality test

data:  Rneglectus$y
w = 0.86626, p-value = 0.2117

t.test(y~Luminosidade, data=Rneglectus)
      welch Two sample t-test

data:  y by Luminosidade
t = 2.1213, df = 4, p-value = 0.1012
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.3088288  2.3088288
sample estimates:
mean in group escuro      mean in group luz
      3.333333              2.333333

#Compara os insetos fora do abrigo em L/E ou escuridão completa para R. robustus
Rrobustus = subset(a, Espécie=="Rrobustus")

```

```

shapiro.test(Rrobustus$y) #dados normais
      shapiro-wilk normality test

data:  Rrobustus$y
w = 0.86904, p-value = 0.2224

t.test(y~Luminosidade, data=Rrobustus)
      welch Two sample t-test

data:  y by Luminosidade
t = 6.3266, df = 2.8594, p-value = 0.009202
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 6.27498 19.72502
sample estimates:
mean in group escuro      mean in group luz
      18.333333          5.333333

#Efeito do ciclo luz/escuridão ou escuridão completa para as 3 espécies
dados = read.table("~/Desktop/Luminosidade.txt", header=T)
attach(dados)
dados$total = rep(40,36)
require(agricolae)
escuridão_completa = subset(dados, Luminosidade=="escuro")
luz_escuridão= subset(dados, Luminosidade=="luz")

#Efeito do ciclo luz/escuridão
luzfora = subset(luz_escuridão, Abrigo=="fora")
shapiro.test(luzfora$y) # dados normais
      shapiro-wilk normality test

data:  luzfora$y
w = 0.87939, p-value = 0.1547

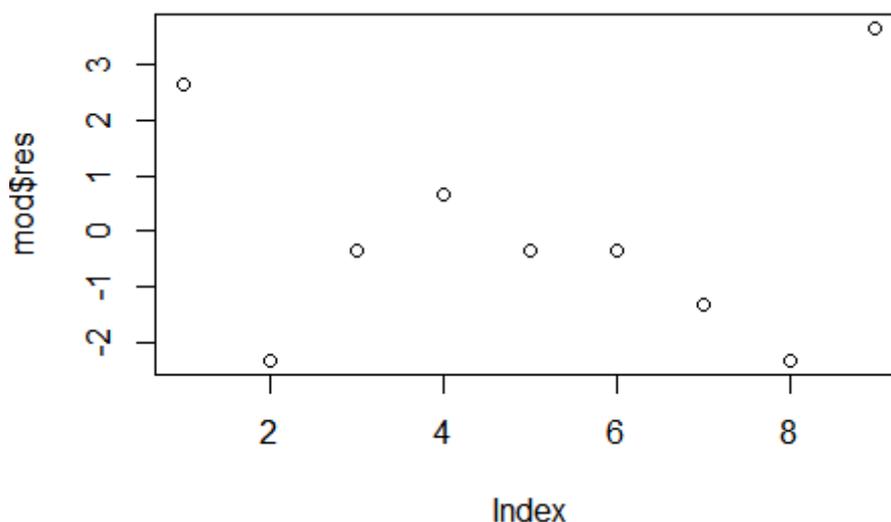
mod = aov(y~Espécie, data=luzfora)
summary(mod) # não há diferença entre as espécies

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Espécie    2    18    9.000   1.588   0.28
Residuals  6    34    5.667

#A suposição de homocedasticidade dos resíduos é quebrada

plot(mod$res) #fura a variância constante

```



Teste não paramétrico para confirmar:

```
kruskal.test(y~Espécie, data=luzfora) #Compara os insetos fora do abrigo em L/E
kruskal-wallis rank sum test
```

```
data: y by Espécie
Kruskal-wallis chi-squared = 2.9449, df = 2, p-value = 0.2294
```

O teste de kruskal wallis concorda com ANOVA

#Efeito do ciclo escuridão completa

```
escuridãofora = subset(escuridão_completa, Abrigo=="fora") # insetos fora do abrigo
shapiro.test(escuridãofora$y) # dados não normais
```

```
shapiro-wilk normality test
```

```
data: escuridão_fora$y
W = 0.75259, p-value = 0.005809
```

```
kruskal.test(y~Espécie, data=escuridãofora) #Compara os insetos fora do abrigo em
escuridão completa
```

```
kruskal-wallis rank sum test
```

```
data: y by Espécie
Kruskal-wallis chi-squared = 5.8531, df = 2, p-value = 0.05358
```

APÊNDICE 3 - Script: Agregação em abrigos e o potencial efeito das fezes

```
# modelo de efeitos principais R. prolixus
dados = read.table("~/Desktop/Rhodnius prolixus_fezes.txt", header=T)
attach(dados)
modelo1 <- glm(y ~ Abrigo + offset(log(Total)),family=poisson,data=dados)
summary(modelo1) # não há inferência do estímulo (fezes) na escolha do abrigo
```

```
Call:
glm(formula = y ~ Abrigo + offset(log(Total)), family = poisson,
    data = dados)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.96856	-0.65812	0.00013	0.61928	2.31123

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.68310	0.08165	-8.366	<2e-16 ***
Abrigoestímulo	-0.02020	0.11606	-0.174	0.862

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

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 33.004 on 19 degrees of freedom
 Residual deviance: 32.974 on 18 degrees of freedom
 AIC: 126.7

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```
# modelo de efeitos principais R. neglectus
dados = read.table("~/Desktop/Rhodnius neglectus_fezes.txt", header=T)
attach(dados)
modelo2 <- glm(y ~ Abrigo + offset(log(Total)),family=poisson,data=dados)
summary(modelo2) # não há inferência do estímulo (fezes) na escolha do abrigo
```

```
Call:
glm(formula = y ~ Abrigo + offset(log(Total)), family = poisson,
    data = dados)
```

```
Deviance Residuals:
```

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.06591	-0.86310	-0.01296	0.78973	1.78921

```
Coefficients:
```

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.72874	0.08513	-8.561	<2e-16 ***
Abrigoestímulo	0.06996	0.11833	0.591	0.554

```
---
```

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

```
(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 23.008 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 22.658 on 18 degrees of freedom
AIC: 116.01
```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 4
```

```
# modelo de efeitos principais R. robustus
dados = read.table("~/Desktop/Rhodnius robustus_fezes.txt", header=T)
attach(dados)
modelo3 <- glm(y ~ Abrigo + offset(log(Total)),family=poisson,data=dados)
summary(modelo3) # não há inferência do estímulo (fezes) na escolha do abrigo
```

```
Call:
glm(formula = y ~ Abrigo + offset(log(Total)), family = poisson,
    data = dados)
```

```
Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.16340 -0.31582  0.00014  0.30870  1.06355
```

```
Coefficients:
```

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.70344	0.08305	-8.471	<2e-16 ***
Abrigoestímulo	0.02048	0.11685	0.175	0.861

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

```
(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 7.1736 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 7.1428 on 18 degrees of freedom
AIC: 101.56
```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 4
```

```
# modelo de efeitos principais R. ecuadoriensis
dados = read.table("~/Desktop/Rhodnius ecuadoriensis_fezes.txt", header=T)
attach(dados)
modelo4 <- glm(y ~ Abrigo + offset(log(Total)),family=poisson,data=dados)
summary(modelo4) # não há inferência do estímulo (fezes) na escolha do abrigo
```

```
Call:
glm(formula = y ~ Abrigo + offset(log(Total)), family = poisson,
    data = dados)
```

```
Deviance Residuals:
```

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.55369	-0.71661	-0.01438	0.67770	1.32414

```
Coefficients:
```

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.72718	0.08771	-8.291	<2e-16 ***
Abrigoestímulo	0.06694	0.12201	0.549	0.583

```
---
```

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

```
(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 14.262 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 13.961 on 18 degrees of freedom
AIC: 106.19
```

```
Number of Fisher Scoring iterations: 4
```

```
# modelo de efeitos principais R. prolixus (fezes sem urina)
dados = read.table("~/Desktop/Rhodnius prolixus_semurina.txt", header=T)
attach(dados)
modelo5 <- glm(y ~ Abrigo + offset(log(Total)),family=poisson,data=dados)
summary(modelo5) # não há inferência do estímulo (fezes) na escolha do abrigo
```

Call:

```
glm(formula = y ~ Abrigo + offset(log(Total)), family = poisson,
     data = dados)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3.07127	-1.07982	-0.01411	0.97590	2.44314

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.71420	0.08422	-8.481	<2e-16 ***
Abrigoestímulo	0.04167	0.11788	0.354	0.724

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

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 44.717 on 19 degrees of freedom
 Residual deviance: 44.592 on 18 degrees of freedom
 AIC: 137.22

Number of Fisher Scoring iterations: 4

APÊNDICE 4 - Script: Avaliação do potencial da mistura química para promover a escolha do abrigo em *Rhodnius prolixus*

```

dado = read.table("~/Desktop/Rhodnius sp_doses.txt", header=T)
modelo1 <- glm(n ~ Dose + Abrigo + offset(log(Total)),family=poisson,data=dado)
summary(modelo1) # através dos p-valores indicados na coluna Pr(>|z|) nem o tipo
do abrigo nem as doses tem efeito significativos no modelo.

```

Call:

```

glm(formula = n ~ Dose + Abrigo + offset(log(Total)), family = poisson,
     data = dado)

```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3.07070	-0.63289	0.00104	0.57265	2.45937

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-7.415e-01	6.672e-02	-11.113	<2e-16 ***
Dose160ng	-8.709e-12	8.313e-02	0.000	1.000
Dose16ng	-8.651e-12	8.313e-02	0.000	1.000
Dose16ug	-8.707e-12	8.327e-02	0.000	1.000
Abrigoestimulo	9.449e-02	5.866e-02	1.611	0.107

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

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 96.987 on 79 degrees of freedom
 Residual deviance: 94.389 on 75 degrees of freedom
 AIC: 462.92

Number of Fisher scoring iterations: 4