

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

A procura do hospedeiro e escolha do sítio de picada por um vetor da doença de Chagas

POR

Raquel Aparecida Ferreira

Belo Horizonte
Fevereiro 2009

TESE DDIP-CPQRR

R.A.FERREIRA

2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

A procura do hospedeiro e escolha do sítio
de picada por um vetor da doença de
Chagas

Raquel Aparecida Ferreira

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

Orientador: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo
Co-orientadores: Dr. Marcos Horacio Pereira
Dr. Claudio Ricardo Lazzari

Belo Horizonte
Fevereiro 2009

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

F383p
2009 Ferreira, Raquel Aparecida.

A procura do hospedeiro e a escolha do sítio de picada por um vetor da Doença de Chagas / Raquel Aparecida Ferreira . – Belo Horizonte, 2009.

xviii, 153 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 153 - 171

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) 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. Doenças de Chagas/transmissão 2. *Rhodnius*/fisiologia 3. *Rhodnius*/parasitologia 4. Triatominae/crescimento e desenvolvimento. I. Título. II. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Orientação) III. Pereira, Marcos Horácio (Co-orientação) e Lazzari, Claudio Ricardo (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

A procura do hospedeiro e escolha do sítio
de picada por um vetor da doença de
Chagas

por

Raquel Aparecida Ferreira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (Presidente)

Prof. Dra. Alessandra Aparecida Guarneri

Prof. Dr. Alexandre Afrânio Peixoto

Prof. Dr. Herton Hélder Rocha Pires

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Suplente: Prof. Dra. Liléia Diotaiuti

Tese defendida e aprovada em: 19/02/2009

A Bida, pelo presente da vida;

Ao Renato, por sempre cuidar-me e proteger-me;

Ao Rogério, pela construção da amizade;

Ao meu pai, que resiste em mim.....

e

Ao Luiz,
por querer-me como eu quero a ele.

v

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a todos os "LATEquianos", porque depois de tantos anos de trabalho juntos sinto-lhes mais amigos do que companheiros de trabalho.

Ao Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, a minha enorme gratidão pela orientação, ultrapaciência, apoio incondicional pelo precioso e constante estímulo, confiança e pelos seus conselhos dedicados desde a iniciação científica.

Ao Dr. Marcos Horácio Pereira, pela orientação, pela imensa generosidade e também pelas constantes palavras de apoio e amizade.

Ao Dr. Claudio Ricardo Lazzari, pela calorosa acolhida e pela oportunidade de aprender através de sua grande experiência e conhecimento.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, nas pessoas dos seus diretores Dr. Álvaro José Romanha e Dr Rodrigo Côrrea, pelo suporte necessário para realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do atual Coordenador Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e também a Dra. Virgínia Torres Schall e Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, pelo empenho nas gestões passadas.

À Dra. Líléia Diotaiuti, por abrir as portas de seu laboratório e acolher tão bem a todos. A você os meus infinitos agradecimentos!

À Dra. Alessandra Guarneri (Ale), pelo constante apoio, cumplicidade, disponibilidade e troca de experiências desde a iniciação científica.

Ao Dr. João Carlos Pinto Dias, exemplo de sabedoria.

À Dra. Teresita Insausti (Tere), minha gratidão pelo carinho, afeto e enorme paciência.

Ao Dr. Alvaro Eduardo Eiras que, de alguma forma, sempre se fez presente em minha formação.

Ao Dr. Nélder de Figueiredo Gontijo, pela boa vontade e atenção demonstrada e sobretudo pelo entusiasmo transmitido no convívio diário.

À secretária Maria Inês de Oliveira Mascarenhas, pelo constante auxílio nos serviços

burocráticos, inclusive fora de hora!

Ao Alberto Gontijo, pela boa vontade no empréstimo de alguns aparelhos fundamentais para uso neste trabalho.

Ao bibliotecário Segemar e aos colegas de informática do René Rachou, pelos serviços prestados.

Ao João de Deus que, durante algum tempo, foi mais orientador do que técnico. Obrigada pela sua enorme boa vontade!

Ao técnico Ademilson (Adê), pelos milhões e milhões de "quebra galhos".

À bacharel em estatística Ana Carolina Lustosa Lima, pela disponibilidade e auxílio em algumas análises feitas nesta tese. Também a Caroline e Grasielle, recém chegadas ao René, mas ainda assim me tiraram algumas dúvidas.

Aos professores do Centro de Pesquisa René Rachou, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do CPqRR, do Departamento de Parasitologia da UFMG e do IRBI que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Andréia e Cristiane, secretárias acadêmicas, pela disponibilidade;

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de eferências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

A CAPES, CPqRR/ FIOCRUZ, FAPEBIO, CNRS, pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos pelos poucos, porém, excelentes dias de trabalho.

Aos meus colegas do IRBI, especialmente Fabienne e Aurèlie, pela paciência e força! Merci a tous!!!

A todos os meus colegas, das distintas etapas da carreira: graduação, mestrado e doutorado, por tudo compartilhado.

Em especial a alguns colegas do Laboratório de Triatomíneos, devido à longa caminhada

em comum: Ale, Dona Maria, João Paulo, Silvinha, Tim e ao Théo (que ainda estão presentes em nosso coração)! Conviver com vocês foi uma enorme alegria!

Às novas integrantes nos estudos de comportamento: Bruna, Ju e Lu. Convivemos o suficiente para que eu as considere muito especiais!

À amiga Ana Cristina Renna de Vitta, por se tornar minha grande amiga e em consequência desfrutarmos não somente da cumplicidade no trabalho, mas também no plano pessoal.

À amiga Gina Pontes, Ginoca, pela alegria de cada dia, e agradeço o respeito, admiração e fidelidade sempre dedicados a mim ao longo destes anos. Compartilho o mesmo por você!....

À amiga Maria Angélica de Oliveira, com quem compartilhei muitos problemas, papos, risadas, conhecimentos, filmes, músicas, cafés e tudo o mais de bom. Minha exaltada admiração e meu muito obrigada!

Ao amigo Dani, que me emocionou com a sua generosidade, apoio e amizade durante a minha estadia em Tours. Sem você, com certeza a França seria mais fria!

A Romi e Sebi, pelo encanto, simpatia, sinceridade e carinho transmitidos em cada reencontro! E que aconteçam mais milhões deles!!

A Ourda e Riab, minhas companheiras estrangeiras em terras estrangeiras. Os momentos que passamos juntas sempre irão comigo!

Aos meus amigos de Florestal por me fazerem sentir que, apesar de nos vermos pouco, estamos sempre juntos.

A todos os meus familiares pelo apoio emocional, verdadeiro, e por acompanhar-me em todos os momentos!

Ao Luiz pela fiel e constante companhia, pela troca de experiências, amizade e dedicação ao longo de todos estes anos.

Sumário

Lista de figuras	XIII
Lista de abreviaturas e símbolos	XVI
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1 Introdução	19
1.1 <i>Rhodnius prolixus</i> e a doença de Chagas	20
1.2 O abrigo: um recurso fundamental para os triatomíneos	22
1.3 Orientação de insetos ao hospedeiro	23
1.4 Comportamento alimentar	29
1.5 Escolha do sítio de picada	32
1.6 Anatomia geral do Sistema Nervoso Central de <i>R. prolixus</i>	34
1.7 Processamento das informações no Sistema Nervoso Central de insetos	35
1.8 Projeções de neurônios sensoriais no Sistema Nervoso Central	36
1.9 Órgãos sensoriais envolvidos na percepção de pistas do hospedeiro	39
2 Justificativa	43
3 Objetivos	45
3.1 Objetivos gerais	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 Materiais e Métodos	48
4.1 Atividade de <i>R. prolixus</i> em associação com abrigos	49
4.1.1 Insetos	49
4.1.2 Desenho experimental	49
4.1.3 Registro e análise dos ensaios	51
4.1.4 Análise estatística	52
4.2 Estudo da capacidade de <i>R. prolixus</i> em avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor	53
4.2.1 Insetos	53
4.2.2 Desenho experimental	54
4.2.3 Arena experimental	56
4.2.4 Ensaios com insetos intactos	56
a) <i>Ensaios em condições de closed-loop</i>	56
b) <i>Ensaios em condições de open-loop - distância fixa</i>	57
c) <i>Ensaios em condições de open-loop - distância dinamicamente variada</i>	58
4.2.5 Ensaios com insetos antenectomizados	59
a) <i>Ensaios em condições de closed-loop</i>	59
b) <i>Ensaios em condições de open-loop</i>	59
4.2.6 Papel do estímulo mecânico na expressão do PER	60
a) <i>Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos</i>	60

<i>intactos</i>	
b) Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos antenectomizados	61
c) Apresentação do estímulo mecânico com insetos intactos	61
d) Apresentação do estímulo mecânico isoladamente em insetos antenectomizados	61
4.2.7 Análise estatística	61
4.3 Avaliação dos mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em <i>R. prolixus</i>	62
4.3.1 Insetos	62
4.3.2 Fonte térmica	62
4.3.3 Experimento 1	63
4.3.4 Experimento 2	64
4.3.5 Registro e análise dos ensaios	65
4.3.6 Análise estatística	66
4.4 Caracterização de estruturas sensoriais do rostro e antena de <i>R. prolixus</i> e suas projeções dentro do SNC	66
4.4.1 Insetos	66
4.4.2 Receptores presentes no rostro de <i>R. prolixus</i>	67
a) Diafanização dos rostros	67
b) Pesquisa de termorreceptores dos rostros através de microscopia eletrônica de varredura (ME)	68
4.4.3 Arranjo anatômico interno do rostro de <i>R. prolixus</i>	68
4.4.4 Projeções de receptores sensoriais no SNC de <i>R. prolixus</i>	70
a) Técnica de difusão de cloreto de cobalto	70
b) Preenchimento de neurônios com neurobiotina	73
c) Preenchimento de neurônios com dextran rodamina	75
5 Resultados	77
5.1 Atividade de <i>R. prolixus</i> associada ao abrigo	78
5.1.1 Atividade de saída de abrigo	78
5.1.2 Atividade locomotora em <i>R. prolixus</i>	79
5.1.3 Efeito do jejum sobre a atividade de <i>R. prolixus</i>	79
a) Saída do abrigo	79
b) Atividade locomotora	80
5.1.4 Padrão temporal de atividade de <i>R. prolixus</i>	80
a) Atividade de saída/entrada de insetos nos abrigos	80
b) Atividade locomotora	83
5.2 Capacidade de <i>R. prolixus</i> em avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor	85
5.2.1 Variação da expressão do PER em função da distância à fonte térmica	85
5.2.2 Insetos intactos em condições de closed-loop	85
5.2.3 Insetos intactos em condições de open-loop	87
a) Ensaios de distância fixa	87
b) Ensaios de distância dinamicamente variada	88

5.2.4	Comparação entre os dados nas condições de <i>closed-loop</i> X <i>open-loop</i>	89
5.2.5	Efeito da antenectomia na expressão do PER	90
a)	<i>Insetos em condições de closed-loop</i>	90
b)	<i>Insetos em condições de open-loop</i>	92
c)	Comparação entre os dados nas condições de <i>closed-loop</i> X <i>open-loop</i>	93
d)	Comparação entre os dados obtidos com insetos intactos X antenectomizados	93
e)	<i>Insetos antenectomizados bilateralmente</i>	94
5.2.6	Papel do estímulo mecânico na expressão do PER	94
a)	Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos intactos	94
b)	Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos antenectomizados	94
c)	Apresentação do estímulo mecânico isoladamente a insetos intactos e antenectomizados	95
5.3	Mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em <i>R. prolixus</i>	95
5.3.1	Experimento 1	95
a)	<i>Insetos antenectomizados unilateralmente</i>	95
b)	<i>Insetos antenectomizados bilateralmente</i>	96
5.3.2	Experimento 2	96
a)	Contactos totais do rostro	96
b)	Contactos prolongados do rostro	97
c)	Número de contatos prolongados do rostro em função da distância à fonte térmica linear	98
d)	Duração média dos contatos prolongados do rostro	99
5.4	Caracterização de estruturas sensoriais do rostro e antena de <i>R. prolixus</i> e suas projeções dentro do SNC	100
5.4.1	Descrição dos receptores presentes no terceiro segmento rostral de <i>R. prolixus</i>	100
5.4.2	Descrição das estruturas internas do rostro de <i>R. prolixus</i>	103
5.4.3	Projeções de células rostrais no SNC	106
5.4.4	Projeções de receptores antenais no SNC	112
5.4.5	Convergência das projeções de neurônios das antenas e do rostro de <i>R. prolixus</i>	116
6	Discussão	118
6.1	Atividade de <i>R. prolixus</i> associada ao abrigo	119
6.1.1	Atividade espontânea em abrigos	119
6.1.2	Efeito dos odores do hospedeiro	119
6.1.3	A estratégia de procura do hospedeiro de <i>R. prolixus</i>	120
6.2	Capacidade de <i>R. prolixus</i> em avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor	123
6.3	Mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em <i>R. prolixus</i>	128
6.4	Caracterização de estruturas sensoriais do rostro e antena de <i>R. prolixus</i> e suas projeções dentro do SNC	131

7 Considerações finais	134
8 Anexos	142
8.1 Anexo I Tampões	143
8.2 Anexo II Durcupan	144
8.3 Anexo III Solução de cloreto de cobalto	145
8.4 Anexo IV Soluções utilizadas na técnica de difusão de neurobiotina	147
8.5 Anexo V Artigo Do Haematophagous Bugs Assess Skin Surface Temperature to Detect Blood Vessels?	148
9 Referências bibliográficas	153

Lista de figuras

Figura 1	Foto de uma fêmea, adulta de <i>Rhodnius prolixus</i> sobre a pele de um hospedeiro. Foto extraída do site: www.osel.cz/_popisky/119_/1191566686.jpg .	22
Figura 2	(Adaptada de Flores, 2001). Variação da intensidade da radiação infravermelha (energia térmica) em função da distância a uma fonte emissora de calor. As curvas correspondem a uma mesma fonte mantida a diferentes temperaturas específicas. Os números sobre as curvas indicam a magnitude do aumento de energia entre dois pontos da curva. Quadro inserto: insetos a diferentes distâncias da fonte são atingidos por diferentes quantidades de energia térmica emitida pela fonte (acontece igualmente com diferentes partes do corpo de um inseto). Esta energia, através da estimulação de termorreceptores, pode fornecer ao animal informações concernentes à posição, temperatura e tamanho da fonte.	27
Figura 3	Esquema ilustrando o processo de penetração da derme de um hospedeiro pelas peças bucais de um triatomíneo (Lavopierre, 1959). Em a , o lábio é ancorado pelos estiletes mandibulares, enquanto os estiletes maxilares penetram a derme. Em b , os estiletes maxilares realizam movimentos à procura de um vaso sanguíneo. Em c , os estiletes maxilares canulam o vaso e inicia-se a alimentação.	32
Figura 4	Desenho esquemático do sistema nervoso central de triatomíneos (adaptado de Insausti, 1994).	35
Figura 5	Desenho esquemático de um neurônio monopolar de inseto e suas estruturas (Chapman, 1998).	36
Figura 6	Desenho esquemático de uma sensila olfativa do tipo tricóide (adaptado de Kaissling, 1987).	42
Figura 7	Desenho experimental para o estudo da atividade locomotora de triatomíneos em abrigos artificiais. À direita, um detalhe do abrigo artificial feito de papelão corrugado.	50
Figura 8	Desenho ilustrativo mostrando o par de eixos ortogonais desenhados na tela do monitor do aparelho de televisão utilizado para quantificar a atividade dos insetos.	52
Figura 9	Foto de uma pastilha com efeito <i>Peltier</i> , semelhante à utilizada nos ensaios. Foto extraída do site (Fonte:) www.jaderfranca.com/blog/wp-content/uploads/2008/08/peltier4.jpg .	55
Figura 10	Esquema ilustrando o interior de uma pastilha com efeito <i>Peltier</i> . Foto extraída do site: www.ppgia.pucpr.br/~santin/ee/2007/1s/3/fig1.jpg .	56
Figura 11	Vista superior da arena.	56
Figura 12	Desenho experimental utilizado, mostrando o inseto suspenso pelo tórax frente a uma placa de alumínio (fonte térmica). Adaptado de Flores (2005).	59
Figura 13	Desenho esquemático da fonte térmica: placa de alumínio + fio de níquel-cromo.	63
Figura 14	Desenho esquemático da arena experimental.	65
Figura 15	Comparação do número total de insetos que saíram do abrigo na ausência e na presença de pistas do hospedeiro (21, 30 e 60 dias de jejum), 6 ensaios realizados em cada série.	78
Figura 16	Comparação da atividade locomotora de insetos na ausência e na presença de pistas do hospedeiro (21,30 e 60 dias de jejum), 6 ensaios realizados em cada série.	79
Figura 17	Variação temporal do balanço da atividade de saída e entrada ao abrigo. A: insetos com 21 dias de jejum; B: insetos com 30 dias de jejum; C: insetos com 60 dias de jejum. Barras pretas: balanço da atividade na ausência de sinais do hospedeiro. Barras cinza: balanço da atividade na presença de sinais do hospedeiro. Os valores representam a média de seis réplicas por série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase; setas/início e fim da escotofase.	82
Figura 18	Atividade locomotora espontânea (barras pretas) e na presença de sinais do hospedeiro (barras cinzas) em ninfas de <i>R. prolixus</i> . A: insetos com 21 dias de jejum; B: insetos com 30 dias de jejum; C: insetos com 60 dias de jejum. Os valores graficados representam a média de seis réplicas por série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase; seta/início e fim da escotofase.	84
Figura 19	Proporção de insetos que apresentaram o PER em função da distância à fonte	86

	térmica. Condições de <i>closed-loop</i> . Série com a fonte a 35°C, N= 30 insetos. Série com a fonte a 40°C, N= 29 insetos.	
Figura 20	Proporção de insetos que tocaram a fonte térmica com as antenas antecipando o PER a 5 mm. Condições de <i>closed-loop</i> , fonte a 40°C. N= 17 insetos.	86
Figura 21	Proporção de insetos que apresentaram o PER em função da distância à fonte térmica. Os ensaios foram realizados em condições de <i>open-loop</i> . N= 25 insetos em ambas as séries.	88
Figura 22	Proporção de insetos que apresentaram o PER em função da distância à fonte térmica durante a sua aproximação manual. Os ensaios foram realizados em condições de <i>open-loop</i> . Série com a fonte a 35°C, N= 31 insetos. Série com a fonte a 40 °C, N= 27 insetos.	89
Figura 23	Relevância do contato antenal na expressão do PER em insetos antenectomizados unilateralmente. Condições de <i>closed-loop</i> . Fonte térmica a 40°C. N= 59.	91
Figura 24	Proporção de insetos antenectomizados unilateralmente que apresentaram PER em função da distância à fonte térmica. Os resultados representados correspondem a insetos que não contataram a superfície da arena com suas antenas antes do PER. Condições de <i>closed-loop</i> . Fonte térmica a 40°C. N= 22.	92
Figura 25	Proporção de insetos antenectomizados unilateralmente que apresentaram PER em função da distância à fonte térmica. Condições de <i>open-loop</i> . Fonte a 40°C. N= 19	93
Figura 26	Distribuição das primeiras picadas, i.e, o primeiro contato do rostro com a fonte térmica, realizados pelos insetos intactos (barras vermelhas, n=34) e antenectomizados unilateralmente (esquerdo: verde, n=34; direito: preto, n=34).	96
Figura 27	Efeito da antenectomia unilateral sobre o número total de contatos do rostro realizados por <i>R. prolixus</i> . Fonte térmica plana a 33°C e fonte térmica linear a 36°C. Insetos antenectomizados (n= 15). Insetos intactos (n= 14).	97
Figura 28	Efeito da antenectomia unilateral sobre a frequência dos contatos prolongados do rostro. Fonte térmica plana a 33°C e fonte térmica linear a 36°C. Insetos antenectomizados n= 15. Insetos intactos n= 14.	98
Figura 29	Proporção média de contatos prolongados do rostro dos insetos em relação à distância da fonte térmica linear. Fonte térmica plana a 33°C e fonte térmica linear a 36°C. Insetos antenectomizados n= 15. Insetos intactos n=14.	99
Figura 30	Efeito da antenectomia unilateral sobre a duração média dos contatos prolongados do rostro. Fonte térmica plana a 33°C e fonte térmica linear a 36°C. Insetos antenectomizados n= 15. Insetos intactos n= 14.	100
Figura 31	Vista por diafanização do último segmento rostral de <i>R. prolixus</i> . A seta destaca um pêlo com aparente função mecano-receptora, escala da barra= 50µm.	101
Figura 32	Vista do último segmento rostral de <i>R. prolixus</i> . Em A, a seta destaca um pêlo com possível função mecano-receptora. Em B, a seta destaca um pêlo com possível função químio-receptora.	103
Figura 33	Corte transversal do segmento rostral proximal de <i>R. prolixus</i> corado por azul de toluidina. C = cutícula, CA= canal alimentar + canal salivar, E MAD= estilete mandibular, E MAX= estilete maxilar, M= músculo, N= nervo, SR= sulco rostral T= traqueíola. Escala da barra= 100 µm.	105
Figura 34	Vista ventral do cérebro e gânglio subesofágico de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de cobalto. Um nervo labial esta indicado por uma seta. A outra seta indica prováveis fibras de neurônios sensoriais provenientes do rostro e corados por cloreto de cobalto. P= protocérebro, D= deutocérebro, T= tritocérebro, GS= Gânglio subesofágico. Escala da barra = 500 µm.	107
Figura 35	Desenho esquemático em vista ventral da reconstrução da trajetória dos neurônios do cérebro e gânglio subesofágico de <i>R. prolixus</i> . P= protocérebro, D= deutocérebro, T= tritocérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= Gânglio protorácico, GPO= Gânglio posterior, NMM= neurópilo maxilar-mandibular, NM= neurópilo mesotorácico.	108
Figura 36	Vista lateral do glânglio subesofágico e do gânglio protorácico de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de cobalto. As setas indicam fibras oriundas de receptores do rostro em posição ventral. P= protocérebro, D= deutocérebro, T= tritocérebro, GS= Gânglio subesofágico.	109
Figura 37	Vista ventral de um detalhe do gânglio protorácico de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de cobalto. A seta indica uma projeção de receptores do rostro. Escala da barra = 50 µm.	109
Figura 38	Vista ventral do gânglio subesofágico de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de	110

	cobalto. A seta mostra o conjunto das projeções de receptores do rostro em forma de "alfa", escala da barra= 100 µm.	
Figura 39	Vista dorsal do gânglio subesofágico e do gânglio protorácico de <i>R. prolixus</i> . A seta mostra fibras do rostro marcadas com neurobiotina. Escala da barra = 100 µm. C = cérebro, GS= gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico	111
Figura 40	Vista dorsal do gânglio subesofágico de <i>R. prolixus</i> . As setas indicam corpos celulares motores marcados com rodamina, C = cérebro, GS= gânglio subesofágico, escala da barra = 100 µm.	112
Figura 41	Vista ventral do sistema nervoso de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de cobalto. As setas mostram projeções dos neurônios das antenas, escala da barra = 100 µm. C = cérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico, GPO= gânglio posterior.	113
Figura 42	Vista ventral do gânglio posterior de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de cobalto. A seta indica o extremo final de uma arborização de um neurônio da antena, escala da barra = 100 µm.	114
Figura 43	Vista dorsal do sistema nervoso de <i>R. prolixus</i> . As setas destacam-se as projeções de neurônios das duas antenas marcadas com rodamina, C= cérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico, escala da barra= 500 µm.	115
Figura 44	Vista dorsal do gânglio protorácico de <i>R. prolixus</i> . As setas indicam projeções de fibras antenais marcadas com rodamina, escala da barra= 100 µm.	116
Figura 45	Vista dorsal do sistema nervoso de <i>R. prolixus</i> corado por cloreto de cobalto. A seta mostra uma região do gânglio subesofágico que aparentemente apresenta conexões de fibras das antenas e do rostro. C = cérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico, escala da barra= 500 µm.	117
Figura 46	Diagrama da série de eventos que ocorrem numa noite típica de alimentação de um triatomíneo. Neste, estão indicados os efeitos endógenos ou motivacionais (lado interno do círculo) e exógenos (lado externo do círculo), fatores que promovem ou modulam os diferentes componentes do comportamento destes insetos. (Adaptado de Guerenstein & Lazzari, 2008).	136

Lista de abreviaturas e símbolos

°C = graus centígrados

% = porcentagem

± = mais ou menos

X = vezes

: = por

< = menor

µl = microlitros

ml = mililitro

µl = micrômetros

mm = milímetros

cm = centímetros

nm = nanômetro

cm² = centímetro quadrado

s = segundo

min = minuto

h = hora

g = grama

Co₂ = dióxido de carbono

ATP = adenosina trifosfato

PER = reflexo de extensão do rostro

SNC = Sistema nervoso central

MO = microscópio óptico

ME = microscópio eletrônico

L/E = luz/escuro

UR = umidade relativa

IR = radiação infravermelha

LEDs = diodo emissor de luz

TV = televisão

N = número

VHS = sistema de vídeo caseiro

pH = potencial hidrogeniônico

n.s = nenhuma significância

Resumo

Rhodnius prolixus Stål (1859) é o principal vetor doméstico da doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e também em países da América Central. Diante desta importância vetorial, realizaram-se diferentes estudos sobre o seu comportamento e fisiologia. Primeiramente, avaliou-se a atividade dos insetos em relação ao uso de abrigos na ausência e na presença de odores de hospedeiro. Demonstrou-se que odores provenientes do hospedeiro modulam a dinâmica de saída e entrada em abrigos, bem como a atividade locomotora em ninfas de *R. prolixus* mantidas em jejum avançado. Posteriormente, estudaram-se aspectos da orientação ao hospedeiro mediada por calor, utilizando uma fonte térmica artificial. Demonstrou-se que, de acordo com estudos anteriores realizados com *Triatoma infestans*, ninfas de *R. prolixus* são capazes de estimar a distância a que se encontra uma fonte de calor sem contato físico com a mesma. Contudo, mostrou-se que os insetos necessitam deslocar-se livremente para conseguirem estimar a distância à fonte. Interessantemente, demonstrou-se que a distância mais freqüente de disparo do PER (reflexo de extensão da probóscide) em *R. prolixus* é a de 5 mm da fonte térmica e que tal distância não varia em função da temperatura da mesma (testes desenvolvidos com fontes a 35 ou 40 °C). Além disto, demonstrou-se que estímulos mecânicos têm um papel como pista sensorial que, integrada às pistas térmicas, são capazes de afetar o desencadeamento do PER em triatomíneos. Posteriormente, aprofundaram-se estudos sobre aspectos comportamentais relacionados com a fase de seleção do local de picada. Para isto utilizou-se uma fonte de calor que simulava a presença de um vaso sanguíneo sob a pele de um hospedeiro. Este aparato era constituído, basicamente, por uma placa de alumínio e um fio de níquel-cromo, ambos termostatizados, de forma que a placa foi mantida a 33°C e o fio a 36°C. Este aparato era recoberto com uma membrana de látex que simulava a textura da pele de um hospedeiro. Demonstrou-se que a integração bilateral das antenas é necessária para guiar corretamente as tentativas de picada dos insetos. Finalmente, realizaram-se estudos anatômico-funcionais do rosto e das antenas dos insetos. Constatou-se que na superfície do rosto de *R. prolixus* não há sensilas termoreceptoras, mas uma grande quantidade de pêlos mecanorreceptores e um número relevante de quimiorreceptores concentrados no extremo distal. Também se evidenciou que as projeções dos neurônios sensoriais do rosto de *R. prolixus* projetam-se no gânglio subesofágico, e subsequentemente, nos gânglios protorácico e posterior. Finalmente, foram encontradas regiões do sistema nervoso central onde há uma aparente convergência entre as fibras das antenas com aquelas oriundas do rosto.

Abstract

Rhodnius prolixus Stål (1859) is the main domestic vector of Chagas disease in Venezuela, Colombia and parts of Central America. In the present investigation, we studied aspects of the behaviour and physiology of this insect related to host search. Firstly, the pattern of locomotion activity was studied with bugs associated to refuges. Besides, we evaluated whether this activity was altered in the presence of host odours. The results showed that host odours promote a significant increase on shelter related activity, i.e. leaving or entering movements, and also on bug locomotion. This could only be observed with bugs starved for 30 or 60 days, but not for 21 days. Insects leaved and entered the shelters at specific moments, after dusk and before dawn, respectively. Subsequently, the use of heat as a stimulus for short distance orientation to the host was studied. A thermal source consisting of a square aluminium plate was used for the study. The results showed that, in accordance with previous studies with *Triatoma infestans*, nymphs of this species were able to estimate the distance to a thermal source. However, our experiments showed that the insects need to walk freely in order to estimate the distance to the source accurately. The proboscis extension reflex (PER) was performed in response to a heat source with maximum frequency at 5 mm from it. The distance at which PER was expressed was independent of the temperature of the thermal source (35 or 40 °C). To our knowledge, this is the first report that demonstrates that mechanical stimuli play a role as sensory cues that, integrated with thermal cues, can affect the expression of the PER in triatomines. Subsequently, some aspects of vessel location were analysed in *R. prolixus*. A thermal source was used to simulate the presence of a blood vessel under the skin of a host. This apparatus was constituted by an aluminium plate and a nickel-chrome wire, both thermostated, at 33°C and 36°C, respectively. This apparatus was covered with a latex membrane to simulate the texture of the skin of a host. The results demonstrated that the bilateral integration of the thermal inputs from both antennae is necessary to correctly guide the biting attempts of the insects. Finally, morphological studies were carried out to study the functional anatomy of the proboscis and the sensory projections from this structure and the antennae of the bugs. No thermo-hygroreceptor could be found on the proboscis of *R. prolixus*. Nevertheless, a great number of mechanoreceptor sensilla could be observed along this structure, as well as a significant number of chemoreceptors at the tip of the rostrum. The results also evinced the presence of projections from sensory axons coming from both the proboscis and the antennae, into several parts of the central nervous system of *R. prolixus*. Finally, potential areas of convergence between the sensory neurons projecting from the antenna and proboscis were reported.

1 Introdução

1.1 *Rhodnius prolixus* e a doença de Chagas

Os triatomíneos são insetos paurometábolos pertencentes à ordem Hemiptera (família Reduviidae, subfamília Triatominae) e são exclusivamente hematófagos em todas as fases da vida. Os seus principais hospedeiros são vertebrados das diversas classes, mas fundamentalmente aqueles endotérmicos. Os triatomíneos apresentam relevância por serem os vetores da doença de Chagas (Chagas, 1911; Lent & Wygodzinsky, 1979; Zeledón & Rabinovich, 1981). O agente etiológico desta enfermidade é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 que é normalmente transmitido pelos insetos aos seres humanos através das fezes liberadas durante e ou após o seu repasto sanguíneo.

A doença de Chagas é um dos principais problemas de saúde pública no continente americano, ao qual se encontra praticamente restrita, apesar de serem detectados alguns casos em outras regiões do planeta devidos às migrações humanas. Atualmente, acomete 8 milhões de pessoas, enquanto outros 28 milhões vivem em áreas de risco (WHO, 2005).

A transmissão vetorial em zonas rurais da América Latina responde por 80% dos casos de doença de Chagas (Dias, 1987). O restante da transmissão do parasito ocorre por outras vias, como a transfusão sanguínea ou a transmissão congênita e, inclusive, ocasionalmente, através de transplantes de órgãos, ingestão de alimentos contaminados ou acidentes em laboratório.

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), o *T. cruzi* é encontrado em mamíferos silvestres, sendo transmitido nesses ambientes por diversas espécies de triatomíneos. A transmissão do parasito aos reservatórios silvestres parece acontecer provavelmente pela predação dos insetos pelos seus próprios hospedeiros, mas a via de transmissão fecal não pode ser descartada neste caso. A colonização das habitações humanas (domicílio e peridomicílio) por triatomíneos, provavelmente ocorre como consequência da ação de degradação dos *habitats* naturais destes insetos pela população humana. No *habitat* artificial, algumas espécies conseguem estabelecer colônias devido a grande oferta de alimento e abrigos, promovendo-se, assim, o desenvolvimento do ciclo doméstico do parasito.

Atualmente, há 141 espécies de triatomíneos descritas, que podem ser agrupadas em 18 gêneros (Galvão *et al*, 2003; Forero *et al*, 2004; Costa *et al*, 2006; Costa & Felix, 2007; Sandoval *et al*, 2007; Martínez *et al*, 2007; Bérenger & Blanchet, 2007). Embora os insetos de todas essas espécies sejam potencialmente

vetores da doença, alguns possuem maior importância epidemiológica. Um exemplo é *Rhodnius prolixus* Stål 1859 (Figura 1), o principal vetor doméstico da doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e também em partes da América Central (Guatemala, Honduras, Nicarágua, El Salvador). Esta importância vetorial justifica a relevância de realizar diversos estudos sobre o seu comportamento e fisiologia.

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), *R. prolixus* é encontrado em galinheiros e pombais e também é comumente encontrado em associação com roedores e aves em diversas espécies de palmeira, sendo estes animais possíveis agentes transportadores na sua dispersão. A sistemática e taxonomia dos insetos pertencentes ao gênero *Rhodnius* é muito discutida por diversos autores. Gamboa (1963) relata que, na América Central, *R. prolixus* parece estar completamente confinado a *habitats* domésticos e peridomésticos. Esse autor relata que, na Venezuela e Colômbia, são encontradas populações domésticas e, ainda, populações silvestres em copas de palmeiras. Segundo esse autor, estes ambientes representam o ecótopo original da espécie. Já Schofield & Dujardin (1999), propõem que *R. prolixus* é uma espécie exclusivamente doméstica, derivada de *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927.



Figura 1: Foto de uma fêmea adulta de *Rhodnius prolixus* sobre a pele de um hospedeiro. Foto extraída do site: www.osel.cz/_popisky/119_/1191566686.jpg

1.2 O abrigo: um recurso fundamental para os triatomíneos

Durante o dia, os triatomíneos são normalmente encontrados em grupos, no interior de abrigos, num estado de imobilidade denominado *akinesis* (Wigglesworth & Gillet, 1934). Estes insetos, quando imóveis, ficam em estreito contato com o substrato e com outros membros da colônia (*tigmotaxia*). Esta tendência somada à sua intensa fototaxia negativa (Reisenman & Lazzari, 1998) leva os triatomíneos a permanecerem agregados dentro de abrigos, no interior de gretas, tocas de madeira, de pedra e outros esconderijos com reduzida iluminação. Durante a noite, estes insetos mostram uma maior atividade, aparentemente iniciando a busca de alimento nas primeiras horas de escuridão e procurando refúgios no fim deste período (Espínola, 1973; Núñez, 1987; Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998).

A atividade espontânea dos triatomíneos tem sido estudada por diversos autores (Espínola, 1973; Núñez, 1982; Setembrini, 1984; Lazzari, 1992). Estes autores analisaram a atividade locomotora de triatomíneos em actômetros com ciclos artificiais de luz/escuridão e temperatura constante. Lorenzo & Lazzari (1998) também avaliaram a atividade locomotora espontânea de triatomíneos em associação com abrigos artificiais. Em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) foi demonstrado que existe um ritmo circadiano de atividade locomotora, com dois picos de atividade controlados de forma endógena: o primeiro no início da escotofase e o segundo no começo da fotofase (Lorenzo & Lazzari, 1998). Foi proposto que os picos de atividade mencionados estariam relacionados com a busca do hospedeiro e do abrigo, respectivamente (Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1998). O nível de atividade espontânea, i.e., atividade promovida por motivação endógena na

ausência de pistas sensoriais emitidas por hospedeiros, de ninfas de *T. infestans* aumenta com o jejum, o que, em consequência, faz com que os insetos apresentem uma maior tendência a permanecerem expostos (Lorenzo & Lazzari, 1998).

Os hospedeiros vertebrados emitem diversas pistas que podem ser utilizadas pelos insetos para detectá-los. Odores liberados pela pele e hálito do hospedeiro, e ainda pelas suas excretas, difundem e podem ser transportados por correntes de ar. O primeiro efeito fisiológico destes compostos pode ser ativar os insetos, e desta maneira, promover o início da sua locomoção. Isso poderá aumentar a probabilidade de que os insetos encontrem pistas direcionais capazes de orientá-los até seus hospedeiros (Guerenstein & Lazzari, 2008).

No presente trabalho, caracterizou-se o padrão de atividade de saída e entrada em abrigos de ninfas de *R. prolixus*, assim como a sua atividade locomotora na ausência de pistas do hospedeiro. Adicionalmente, avaliamos se o nível de jejum dos insetos afeta a expressão de tais atividades relacionadas ao uso de abrigos. Além disto, foi analisado se há uma modulação temporal da expressão dessas atividades ao longo da escotofase. Finalmente, avaliamos se a presença de sinais químicos emitidos por hospedeiros é capaz de ativar a saída dos insetos dos seus abrigos e incrementar o nível de atividade locomotora apresentado pelos mesmos.

1.3 Orientação de insetos ao hospedeiro

Segundo Bernard (1970), os insetos hematófagos passam por cinco etapas durante a sua orientação e contato com o hospedeiro. A primeira destas é a detecção e orientação à longa distância, que é seguida pela aproximação e orientação à curta distância. Após a chegada ao hospedeiro, estabelece-se um contato do inseto com a pele, a sondagem em busca de um vaso para obter o sangue e, finalmente, dá-se o início da alimentação.

Os insetos utilizam diferentes pistas provenientes do corpo dos hospedeiros na detecção, localização e orientação até estes. No caso das principais espécies transmissoras do *T. cruzi*, como *R. prolixus* e *T. infestans*, a orientação aos hospedeiros depende da percepção, principalmente, de pistas de modalidades química e térmica (Núñez, 1982; Lazzari & Núñez, 1989; Taneja & Guerin, 1995; 1997; Schmit 2000; Barrozo & Lazzari, 2004a; Barrozo & Lazzari, 2004b; Barrozo & Lazzari, 2006). Destas, a principal pista usada pelos triatomíneos é o calor radiante emitido pelos animais de sangue quente (Lazzari & Núñez, 1989). A pista térmica é

a única capaz de induzir os insetos a expressar o reflexo de extensão de probóscide (PER) e, conseqüentemente, a picar objetos quentes (Lazzari & Nuñez, 1989; Flores & Lazzari, 1996; Wigglesworth & Gillett, 1934). Em sua ausência, outras pistas podem induzir orientação (Nuñez, 1987; Taneja & Guerin, 1995; Guerenstein & Guerin, 2001), mas não a resposta de picada e a alimentação (Lazzari, 1990).

Wigglesworth & Gillet (1934) descreveram que *R. prolixus* é atraído por fontes térmicas com temperatura entre 35 a 38 °C. Lazzari & Nuñez (1989) também demonstraram que *T. infestans* é atraído por fontes de calor radiante. Ambos os trabalhos citados acima descreveram que *R. prolixus* e *T. infestans* movimentam as antenas nos planos horizontal e vertical durante a sua trajetória até a fonte térmica. Ainda, segundo esses autores, este movimento é acompanhado por atividade locomotora e extensão do rostro quando o inseto já se encontra próximo da fonte térmica, i.e., 1-2 cm. Lazzari & Nuñez (1989), demonstraram que a atividade locomotora e a freqüência dos movimentos antenais são aumentadas frente à elevação da temperatura da fonte de calor em *T. infestans* e sugerem, diante destes dados, que as antenas estão envolvidas na aquisição de informação térmica sobre a fonte alimentar. Adicionalmente, esses autores também demonstraram que *T. infestans* é capaz de distinguir fontes de calor radiante mantidas a distintas temperaturas (32° a 45°C) ou mantidas a diferentes distâncias. Ou seja, os triatomíneos mudam a sua resposta de acordo com a temperatura da fonte térmica, independente da sua área ou da distância a qual esta se encontra.

As antenas possuem a capacidade de detectar a radiação infravermelha emitida pelo corpo dos hospedeiros (Lazzari & Nuñez, 1989; Schmitz et al, 2000). Esta capacidade sensorial, aparentemente única entre os artrópodes hematófagos, permite-lhes detectar seus hospedeiros sem necessidade de correntes de convecção que transportem o calor ou de contato físico com a fonte de calor. Entretanto, os processos fisiológicos pelos quais essa informação é obtida não são conhecidos. Outros artrópodes hematófagos utilizam os movimentos de convecção do ar gerados pelo calor emitido pelos seus hospedeiros para se orientar e aproximar deles, como por exemplo os mosquitos (Bar-Zeev et al 1977; Brown, 1951).

Flores (2005) realizou um experimento em que manteve triatomíneos em condições de open-loop, i.e., situação na qual o estímulo apresentado se mantém constante e não é modificável pela resposta comportamental do inseto. Numa

primeira série de ensaios, os insetos foram estimulados com uma fonte térmica que era mantida a temperatura fixa, porém apresentada a diferentes distâncias. Numa segunda série, o tamanho da fonte apresentada aos insetos foi modificado, sem que sua distância ou temperatura variassem. Para os dois casos, foi evidenciada uma forte correlação entre os ângulos de abertura das antenas apresentados pelos insetos e os ângulos subtendidos pela fonte. Isto ocorreu independentemente do tamanho da fonte usada ou da distância a que era apresentada em cada série experimental. Esses resultados revelaram diversos aspectos da sensibilidade térmica dos triatomíneos. Primeiro, estes insetos podem controlar ativamente a posição de suas antenas, de acordo com o tamanho aparente da fonte térmica. Segundo, há uma convergência multimodal das informações sensoriais durante a orientação a fontes térmicas, visto que a entrada de proprioceptores antenais é integrada com a informação térmica para produzir os movimentos das antenas. Finalmente, os dados dessa autora demonstraram que os triatomíneos podem estimar o tamanho aparente de um objeto. Este fato gera uma pista de como os insetos reconhecem um hospedeiro pela sua temperatura. Desta forma, há diversas informações que podem ser avaliadas a partir da energia radiante emitida por uma fonte de calor. O seu tamanho, temperatura e a distância a que se encontra, dentre outros, são informações relevantes que, integradas devidamente, podem definir se um objeto quente está próximo e é grande, ou se está afastado e é pequeno. Um objeto grande e quente, mantido à longa distância, pode produzir o mesmo padrão de estimulação nas antenas dos insetos do que um objeto quente e pequeno colocado à curta distância, i.e., os ângulos subtendidos por ambos os objetos serão semelhantes. Diversas características da fonte, como distância, temperatura e forma, podem proporcionar ao inseto informações adicionais e valiosas. De fato, os triatomíneos são capazes de reconhecer o hospedeiro integrando os estímulos térmicos recebidos pelas antenas com informações relacionadas à distância e o tamanho da fonte (Flores, 2001). Junto com a sua temperatura, estas duas variáveis afetam diretamente a quantidade de calor recebido pelos termoreceptores das antenas dos insetos. Cabe ressaltar que as três variáveis, combinadas de múltiplas maneiras, podem apresentar a mesma quantidade de calor. No entanto, ainda são necessários estudos que descrevam os mecanismos fisiológicos subjacentes a esta capacidade sensorial.

De acordo com as leis da termodinâmica, o calor que atinge um termoreceptor

depende de três variáveis: a distância, a área e a temperatura da fonte térmica (mais precisamente, a diferença entre a temperatura da fonte e aquela do meio ambiente). O mecanismo pelo qual os triatomíneos estimam a distância de uma fonte térmica não foi ainda esclarecido, mas, de acordo com Flores (2005), processos simples podem estar envolvidos. Os insetos poderiam integrar bilateralmente as entradas sensoriais das antenas por triangulação, comparando a quantidade de calor recebido simultaneamente por termorreceptores localizados em diferentes locais no corpo, e.g., cada antena (Wigglesworth & Gillett, 1934; Flores & Lazzari, 1996). Os insetos também poderiam avaliar, por meio de um único sistema termoreceptor, a taxa de aumento da estimulação térmica causada pelo seu próprio deslocamento (Figura 2). A segunda possibilidade é sugerida como hipótese alternativa, a partir de resultados obtidos com insetos antenectomizados (Flores & Lazzari, 1996). Neste caso, os animais podem comparar estímulos térmicos recebidos pelo mesmo termoreceptor em ocasiões consecutivas durante sua aproximação a fonte térmica. Os sucessivos estímulos recebidos, dessa maneira, podem fornecer informação adequada para derivar a distância da fonte (Flores, 2001).

Barrozo *et al* (2003) demonstraram, pela primeira vez, que a umidade relativa é capaz de promover, isoladamente, a orientação de insetos hematófagos e relacionaram seus resultados com a orientação dos triatomíneos ao hospedeiro. Estes autores demonstraram que *T. infestans* é atraído por fontes de umidade situadas a um máximo de 5 cm de distância dos insetos.

Além do calor e a umidade, há outros estímulos que podem permitir a orientação dos insetos hematófagos ao hospedeiro. Um grande número de trabalhos com insetos hematófagos relata respostas fisiológicas ou comportamentais frente a pistas químicas associadas com a presença de hospedeiros vertebrados (Bar-Zeev *et al*, 1977; Burssel *et al*, 1988; Takken & Kline, 1989; Taneja & Guerin, 1995; Groenendijk *et al*, 1996; Torr *et al*, 1996; Takken & Knols, 1999; Braks *et al*, 2001; Steib *et al*, 2001; Barrozo & Lazzari, 2004a; Barrozo & Lazzari, 2004b; Smallegange *et al*, 2005; Guerenstein & Lazzari, 2008).

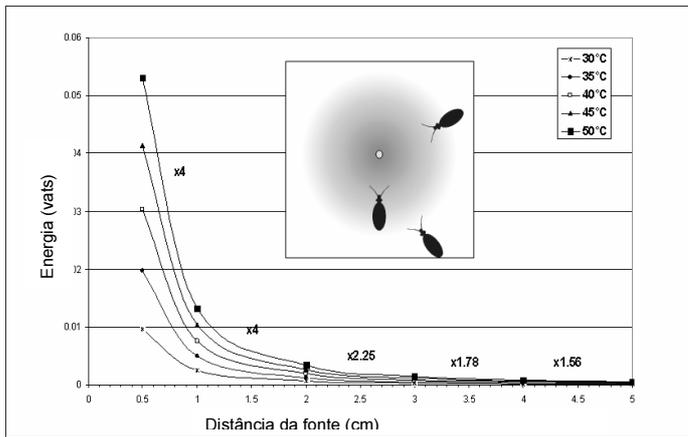


Figura 2 (Adaptada de Flores, 2001). Variação da intensidade da radiação infravermelha (energia térmica) em função da distância a uma fonte emissora de calor. As curvas correspondem a uma mesma fonte mantida a diferentes temperaturas específicas. Os números sobre as curvas indicam a magnitude do aumento de energia entre dois pontos da curva. Quadro inserto: insetos a diferentes distâncias da fonte são atingidos por diferentes quantidades de energia térmica emitida pela fonte (acontece igualmente com diferentes partes do corpo de um inseto). Esta energia, através da estimulação de termoreceptores, pode fornecer ao animal informações concernentes à posição, temperatura e tamanho da fonte.

Normalmente, insetos hematófagos podem perceber plumas de odores provenientes do hospedeiro ou mesmo de um indivíduo do sexo oposto. Após a percepção de odores potencialmente atraentes, os insetos podem iniciar o voo orientado em direção às correntes de ar. A esta resposta comportamental direcionada contra a direção da corrente de ar associada ao estímulo dá-se o nome de anemotaxia positiva. O dióxido de carbono (CO_2), eliminado pelos hospedeiros vertebrados, constitui um sinal químico de uso quase universal por artrópodes hematófagos para a busca dos seus hospedeiros. Um exemplo é o mosquito *Aedes aegypti*, que apresenta uma resposta de anemotaxia positiva frente a correntes de ar enriquecidas com CO_2 (Eiras & Jepson, 1991; Geier *et al.*, 1999a). Eiras & Jepson (1991) demonstraram que o nível de atividade de voo deste mosquito está positivamente correlacionado com a concentração de CO_2 presente no ar.

O ácido láctico é um atraente fraco para diferentes espécies de mosquitos quando apresentado como estímulo único (Geier *et al.*, 1996; Braks *et al.* 2001). Entretanto, combinado ao dióxido de carbono a resposta de atração aumenta a níveis muito superiores aqueles observados quando cada um dos compostos é apresentado isoladamente (Eiras & Jepson, 1991; Geier *et al.*, 1999 a; Steib *et al.*, 2001; Dekker *et al.*, 2002). Em *T. infestans* Barrozo & Lazzari (2004b) demonstraram que quando apresentado isoladamente o ácido láctico não promove nenhum tipo de resposta orientada a este sintético. Contudo, quando esta substância é combinada com uma concentração de CO₂, *T. infestans* mostra uma resposta, sendo a dose de 100 µm de L-ácido láctico adicionado com 300 ppm de CO₂ a única efetiva (Barrozo & Lazzari, 2004b).

Além do CO₂, há vários outros compostos utilizados por insetos hematófagos na localização e orientação aos hospedeiros. Tais compostos são normalmente chamados cairômonios e têm a característica comum de modular a orientação dos insetos nas correntes de ar, quando na procura dos seus hospedeiros. Um cairômonio relevante é o 1-octen-3-ol, um composto presente no ar exalado e nas excretas de diversos vertebrados. O composto foi testado com sucesso na atração de *Glossina morsitans* (Bursell *et al.*, 1988; Vale *et al.*, 1988). Para várias espécies de mosquitos, foi demonstrado que o 1-octen-3-ol interage de forma sinérgica com o dióxido de carbono (Takken & Kline, 1989; Van Essen *et al.*, 1994). Outro cairômonio que também constitui um sinal atraente relacionado com a presença do hospedeiro é a amônia (Smallegange *et al.*, 2005). Além disto, a amônia, combinada ao ácido láctico e a dois ácidos graxos, parece ser bastante atraente para *Aedes aegypti* (Bosch *et al.*, 2000).

Em triatomíneos, já foi descrita atração por CO₂ em *R. prolixus* e *T. infestans* (Núñez, 1982; Taneja & Guerin, 1995; Barrozo *et al.*, 2004a; Barrozo & Lazzari, 2004b). Os insetos desta espécie apresentam anemotaxia positiva frente a correntes de ar, quando são adicionadas a estas pequenas quantidades de CO₂ (Núñez, 1982; Taneja & Guerin, 1995; Barrozo *et al.*, 2004a). Ainda, essa resposta é mais intensa nas primeiras horas da fase escura, sendo tal modulação diária controlada por um mecanismo de relógio endógeno (Barrozo *et al.*, 2004a).

Guerenstein & Guerin (2001) demonstraram, através do uso de um compensador de marcha, que *T. infestans* é atraído por correntes de ar associadas a ácido isobutírico. Além disso, esses autores demonstraram que nonanal,

acrescentado a correntes de ar, promove um aumento na velocidade de marcha dos insetos, mas não modula a sua orientação. Barrozo (2003) demonstrou, através da técnica de eletroantenografia (EAG), que a antena de *T. infestans* apresenta respostas ao ácido láctico, 1-octen-3-ol e vários ácidos graxos de cadeia curta, sendo estas respostas dose dependentes. A mesma autora demonstrou a existência de anemotaxia positiva em *T. infestans* frente a correntes de ar que apresentam 1-octen-3-ol (Barrozo & Lazzari, 2004a) e também frente a correntes de ar que apresentam ácido láctico junto com uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta, i.e., ácido propanóico, ácido butírico e ácido valérico (Barrozo & Lazzari, 2004b). Todos os compostos químicos citados acima são odores associados com a presença de hospedeiros endotermos, dos quais os triatomíneos obtêm o sangue. Particularmente, os ácidos graxos de cadeia curta são caracteristicamente produzidos pela flora bacteriana da pele dos seres humanos (Knols *et al.* 1997).

1.4 Comportamento alimentar

O ciclo de vida e a dinâmica populacional dos triatomíneos dependem de maneira crítica da interação com seus hospedeiros vertebrados. Os triatomíneos são insetos hemimetábolos de tamanho relativamente grande e, por isto, necessitam de quantidades consideráveis de sangue em todos os seus estádios de desenvolvimento (Schofield, 1994). Enquanto uma fêmea adulta de *T. infestans* ingere em torno de 350 µl de sangue em um único repasto (Guarneri *et al.*, 2000), o volume de sangue ingerido por uma fêmea do gênero *Anopheles* é de aproximadamente 2 µl; no caso de *Culex*, 3 µl, e das moscas do gênero *Glossina*, 30 µl (Lehane, 1991).

Os triatomíneos são insetos solenofágicos e, portanto, retiram o sangue diretamente dos vasos sanguíneos, i.e., vênulas ou arteríolas (Lavoipierre *et al.*, 1959). O rosto dos triatomíneos engloba o fascículo, que é composto pelas duas maxilas, e as duas mandíbulas. Uma das funções das peças bucais dos triatomíneos, de fato a inicial, é a de penetrar a pele do hospedeiro. As mandíbulas ancoram o fascículo na superfície da pele, enquanto as maxilas, que são controladas por grandes músculos associados à sua base, penetram na derme, mediante fortes movimentos, atuando como um par de lâminas de corte. Após a penetração na derme e a detecção de um vaso sanguíneo, as maxilas atuam como uma agulha hipodérmica que "canula" o vaso. Assim, após a canulação começa o

processo de ingestão de sangue (Figura 3). O canal salivar e o alimentar são formados pela justaposição dos sulcos presentes em cada maxila. Durante a fase de sondagem as maxilas permanecem juntas, realizando movimentos oscilatórios à procura do vaso sanguíneo (Figura 3). Após a penetração no vaso, a maxila esquerda coloca-se numa posição retraída em relação à direita, formando a "boca funcional", o que antecede a sucção de sangue (Lavoipierre *et al*, 1959). Segundo Friend & Smith (1971), durante a fase de sondagem, *R. prolixus* retira periodicamente amostras do líquido que rodeia a ponta das maxilas, analisando-o com os quimio-receptores epifaríngeos. Quando a dieta contém ATP, esta fase demora de 15-25 segundos, sendo que este tempo aumenta quando é oferecida uma solução salina sem esse fagoestimulante (Friend & Smith, 1971).

De maneira geral, ao introduzirem suas peças bucais na pele do hospedeiro em busca de sangue, os artrópodes hematófagos induzem várias reações reparadoras ou de defesa (Ribeiro & Franschetti, 2003). Entre elas estão a agregação plaquetária, a contração do vaso lesado, a coagulação sanguínea (os três mecanismos da hemostasia), o aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia leucocitária (Ribeiro & Franschetti, 2003). Além disto, as reações inflamatórias e de hemostasia podem ser exacerbadas com o desenvolvimento de uma resposta imune contra os antígenos presentes na saliva destes artrópodes. Portanto, durante a hematofagia, podem ser promovidas algumas ou todas estas reações, que vão dificultar a ingestão de sangue (Ribeiro, 1987).

Por outro lado, a alimentação sanguínea é facilitada pela saliva do artrópode, que é inoculada dentro da pele do hospedeiro durante a fase de sondagem ("probing") e de ingurgitamento. Na saliva dos artrópodes hematófagos já foi descrita uma variedade de substâncias que auxiliam a obtenção de sangue do hospedeiro por apresentarem atividade anti-hemostática. Dentre elas foram relatadas substâncias com atividade anticoagulante (Hellman & Hawkins, 1964, 1965; Ribeiro *et al*, 1995; Pereira *et al*, 1996), vasodilatadora (Ribeiro *et al*, 1990, 1993) e inibidora da agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e ácido araquidônico (Ribeiro, 1995).

Além das atividades anti-hemostáticas, na saliva de insetos hematófagos são encontradas substâncias que podem diminuir indiretamente a irritação do hospedeiro induzida pela picada. Exemplo disso é a atividade anti-histamínica, que dificulta a ligação da histamina nas terminações nervosas livres, retardando o aparecimento do

prurido (Ribeiro & Walker, 1994). Adicionalmente, a atividade da enzima sialidase dificulta a taxia para o sítio da picada das células polimorfonucleares, a qual é induzida pelo ácido siálico. Como consequência disso, esse processo diminui a reação inflamatória (Amino *et al*, 1998). Finalmente, há relatos de atividade imunossupressora para dificultar a exacerbação da resposta inflamatória induzida pela resposta imune (Kalvachova *et al*, 1999). Até o momento, o único relato de uma ação direta sobre a atividade nervosa foi descrito exclusivamente para *T. infestans*, já que a saliva deste inseto inibe a geração do impulso nervoso afetando a corrente de sódio (Dan *et al*, 1999).

Durante a fase de sondagem (Friend & Smith, 1971) e durante toda a fase de ingurgitamento (Ribeiro & Garcia, 1980; Soares *et al*, 2006) ocorre salivação. Além disto, Soares *et al* (2006) demonstraram a saliva é liberada logo após a picada. Na fase de busca dos vasos, a saliva é liberada frequentemente dentro da pele do hospedeiro, ao redor dos vasos sanguíneos. Durante a fase de ingurgitamento, a saliva é liberada em jatos dentro dos vasos sanguíneos e, comumente, ela é sugada pelo inseto juntamente com o sangue. A deposição da saliva na microcirculação é contínua e modulada pela frequência da bomba cibarial. Isto é assim, uma vez que a bomba, quando funciona em alta frequência, suga parte da saliva junto com o sangue para dentro do intestino do inseto. Soares *et al* (2006) sugerem que, este mecanismo pode determinar a quantidade de saliva que será depositada na microcirculação e, como consequência, minimizar a resposta imune do hospedeiro aos antígenos presentes na saliva dos insetos.

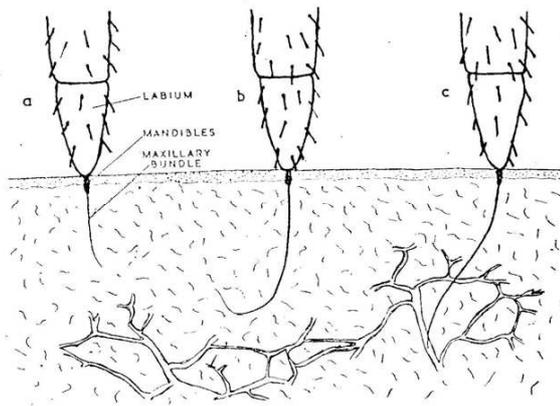


Figura 3: Esquema ilustrando o processo de penetração da derme de um hospedeiro pelas peças bucais de um triatomíneo (Lavopierre, 1959). Em **a**, o lábio é ancorado pelos estiletes mandibulares, enquanto os estiletes maxilares penetram a derme. Em **b**, os estiletes maxilares realizam movimentos à procura de um vaso sanguíneo. Em **c**, os estiletes maxilares canulam o vaso e inicia-se a alimentação.

1.5 Escolha do sítio de picada

Sabe-se que alguns insetos hematófagos têm preferência por picar certas partes do corpo de seus hospedeiros. Um exemplo disso é *Anopheles gambiae*, um mosquito altamente antropofílico (Knols *et al*, 1994; De Jong & Knols, 1995; Takken & Knols, 1999) que prefere picar os pés dos seres humanos. Esta preferência deve-se ao fato de ser atraído por correntes de ar associadas com ácidos graxos de cadeia curta, oriundos da pele dos pés humanos (Knols & Jong, 1996). Cabe salientar que tais odores são provenientes da atividade metabólica de bactérias do gênero *Corynebacterium*, que degradam compostos químicos presentes sobre a pele humana (Knols & Jong, 1996). Já um mosquito que apresenta zoofilia, como *Anopheles atroparvus*, prefere picar na região do rosto dos seus hospedeiros, pois é atraído especialmente pelo dióxido de carbono, emitido na respiração dos vertebrados.

Belkaid *et al* (2000) descreveram uma maior eficiência do processo alimentar de *Phlebotomus papatasi* em sítios específicos da pele do hospedeiro. Esses autores demonstraram que a reação de hipersensibilidade (tipo IV), produzida na

pele do hospedeiro como consequência das suas picadas prévias, facilita a sua posterior alimentação nos mesmos locais. Isso parece ser provocado pelo aumento do fluxo local de sangue devido à resposta inflamatória (Belkaid *et al*, 2000). Os autores discutem que é provável que componentes salivares tenham sido selecionados por exacerbarem tais respostas na pele do hospedeiro, favorecendo a alimentação nestes locais em comparação com a alimentação em pele normal.

Ferreira *et al* (2007) demonstraram pela primeira vez em insetos hematófagos que *R. prolixus* prefere sítios específicos da pele do hospedeiro para picar. Estes autores demonstraram que *R. prolixus* pode avaliar a diferença de temperatura existente entre os vasos sanguíneos e os tecidos adjacentes e utilizá-la na localização dos vasos. Através de análises de termografia, utilizando uma câmera sensível à luz infravermelha, estes autores evidenciaram que há diferenças de temperatura entre os vasos e tecidos adjacentes. Posteriormente, fontes de calor *ad hoc* que simulavam os gradientes de temperatura presentes aos lados de um vaso sanguíneo foram apresentadas aos insetos. O padrão de comportamento registrado evidenciou a importância das pistas térmicas na seleção do local mais apropriado para a picada.

Ferreira (2004) avaliou aspectos relacionados com o comportamento dos insetos durante o contato com o hospedeiro. Para isto, utilizou uma fonte térmica que simulava os gradientes de temperatura existentes entre os vasos sanguíneos e a pele do hospedeiro. Essa fonte térmica era constituída por um bloco de alumínio sobre o qual era fixado um fino arame de níquel cromo (diâmetro de 300 μm), ambos com a temperatura controlada por termostatos independentes. Em alguns dos ensaios do último trabalho citado, a fonte térmica foi coberta por uma membrana de látex, a fim de simular a textura da pele de um hospedeiro. Nesse estudo foi determinado que os insetos alteram seu comportamento de picada quando testados com fontes com ou sem cobertura de látex. Portanto, tal estudo definiu diferentes categorias de picada. As categorias foram: a) contatos rápidos i.e., contatos nos quais os insetos permaneciam com o rostro sobre um mesmo ponto da fonte por menos de 1,5 segundos; b) contatos prolongados, i.e., aqueles nos quais os insetos permaneciam com o rostro apoiado num mesmo ponto da fonte por mais de 1,5 s; e c) contatos em forma de varredura, i.e., aqueles nos quais os insetos deslizavam o extremo do rostro por vários pontos da fonte ininterruptamente. Ressalta-se que o trabalho mencionado demonstra que os contatos do tipo prolongado foram

observados somente nos ensaios em que a placa foi coberta com látex. Ferreira (2004), além de descrever os tipos de picada, também avaliou a sua frequência em função da distância ao arame aquecido. No presente trabalho, foi realizada uma comparação dos dados obtidos por Ferreira (2004) nos ensaios em que a fonte foi coberta pela membrana de látex e que os insetos tinham as antenas intactas com dados obtidos com insetos antenectomizados uni ou bilateralmente. A retirada das antenas tem por finalidade avaliar o papel da integração bilateral das informações térmicas durante o processo de escolha do sítio de picada sobre a pele do hospedeiro.

1.6 Anatomia geral do sistema nervoso central de *R. prolixus*

R. prolixus, assim como outros triatomíneos, possui uma cabeça tubular, com os músculos da bomba faríngea localizados anteriormente e o cérebro localizado posteriormente dentro da cápsula cefálica (Insausti, 1994). A maior parte do cérebro consiste do protocérebro e os lóbulos ópticos. O deutocerebro e tritocerebro de *R. prolixus* situam-se numa posição ventral e posterior em relação ao protocérebro (Barrozo *et al*, 2008). O tritocerebro é pequeno e situa-se entre os lóbulos antenais, de cada lado do esôfago (Figura 4, Insausti, 1994; Barrozo *et al*, 2008). O gânglio subesofágico (Figura 4, Insausti, 1994; Barrozo *et al*, 2008) é localizado posteriormente em relação ao deutocerebro. O cérebro (Figura 4, Insausti, 1994; Barrozo *et al*, 2008) e o gânglio subesofágico são conectados de forma estreita por um par de conexivo espesso circumesofágico e, assim, estas estruturas aparecem como uma única massa (Figura 4, Insausti, 1994; Barrozo *et al*, 2008). Um par de conexivos interganglionares longos e espessos dirige-se do gânglio subesofágico para o gânglio protorácico e outro par de conexivo do gânglio protorácico, para o posterior. O gânglio protorácico é localizado perto do prosterno e o gânglio posterior, próximo do mesosterno (Insausti, 1994). Estes gânglios são claramente separados um do outro e seus conexivos são fundidos medialmente. O gânglio posterior é formado pela fusão dos gânglios mesotorácico, metatorácico e abdominal (Figura 4, Insausti, 1994).

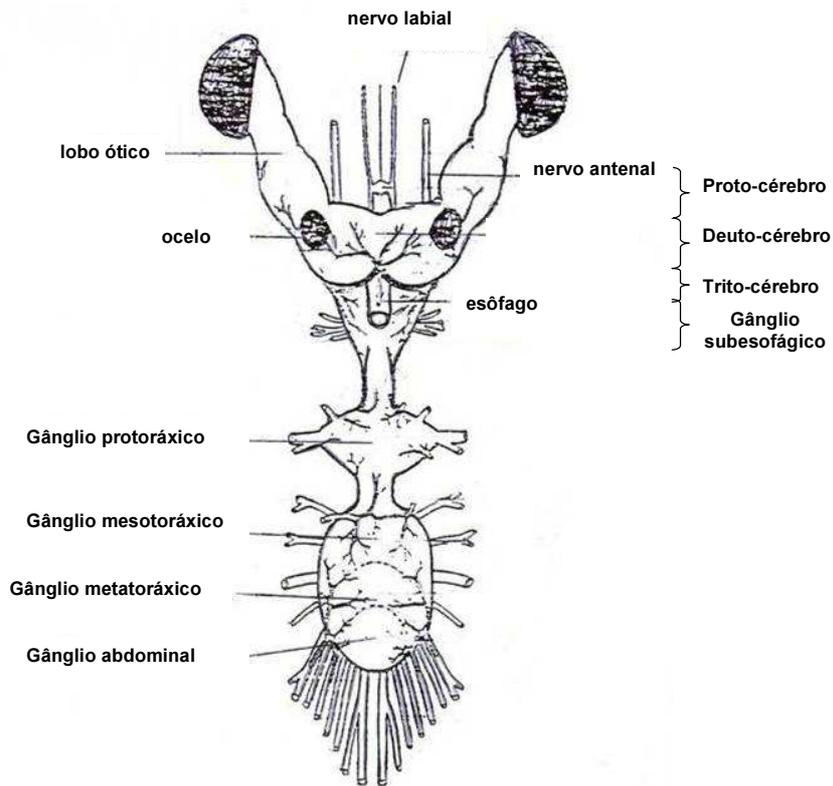


Figura 4: Desenho esquemático do sistema nervoso central de triatomíneos (adaptado de Insausti, 1994).

1.7 Processamento das informações no Sistema Nervoso Central de insetos

O sistema nervoso é um processador de informações e um sistema de condução de sinais que assegura um rápido funcionamento e uma coordenação de efeitos, produzindo e modificando a resposta dos insetos frente a estímulos recebidos pelos órgãos sensoriais periféricos (Chapman, 1998).

Os neurônios, principais células do sistema nervoso central (SNC) dos animais, são caracteristicamente monopolares no SNC dos insetos. Isto é, o corpo celular ou soma possui uma única projeção, que é o neurito, do qual se projetam os dendritos e

o axônio (Figura 5, Chapman, 1998). O axônio é uma ramificação, normalmente a mais longa do neurônio, responsável pelo carreamento das informações para outras células. Já os dendritos também são projeções do neurônio especializadas na recepção de informações que podem ser vindas do meio externo (neurônios sensoriais), do meio interno (neurônios proprioceptores), ou de outros neurônios (interneurônios e neurônios motores).

Segundo Blum (1985), uma transmissão neural normalmente origina-se de uma via de entrada (estrutura sensorial) sobre um axônio aferente (fibra) para um interneurônio no SNC e deste via um axônio eferente para um efetor (neurosecretores ou células musculares). Os pontos nos quais os neurônios recebem informações vindas de outros neurônios são conhecidos como sinapses. A transmissão de informação nas sinapses é normalmente unidirecional e é quimicamente mediada, mas pode haver sinapses elétricas. O número de sinapses em uma célula não é necessariamente constante, mudanças podem ocorrer no desenvolvimento pós-embriário e também em decorrência da experiência do inseto (Chapman, 1998).

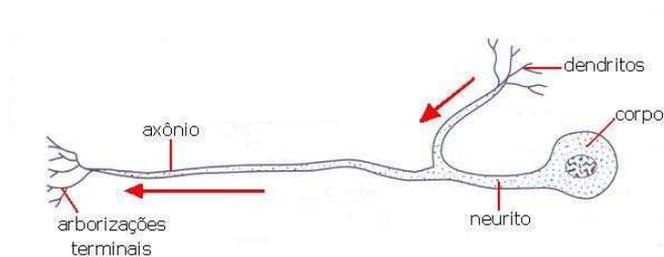


Figura 5: Desenho esquemático de um neurônio monopolar de inseto e suas estruturas (Chapman, 1998).

1.8 Projeções de neurônios sensoriais no Sistema Nervoso Central

Existem poucos estudos sobre aspectos morfofuncionais dos receptores presentes no rostro de triatomíneos, bem como sobre a morfologia interna deste apêndice. Alguns autores descrevem a presença de receptores olfativos, gustativos e de mecanorreceptores, no rostro destes insetos (Bernard 1974; Catalá, 1996). Adicionalmente, foi descrito um tipo de sensila coelocônica em *R. neglectus* que, possivelmente, teria função termo-higroreceptora (Catalá, 1996). Em relação à morfologia interna das peças bucais de triatomíneos, Barth (1953) evidenciou

aspectos relacionados à sua anatomia e histologia. Este autor descreve o arranjo geral das estruturas encontradas dentro do rostró destes insetos. Posteriormente, Pinet (1970) e Bernard (1974) realizaram estudos em *R. prolixus* e *T. infestans*, respectivamente, descrevendo a estrutura interna dos seus estiletes maxilares e mandibulares através de microscopia eletrônica de transmissão.

Em relação a projeções de receptores sensoriais no sistema nervoso central (SNC) de triatomíneos, os únicos estudos existentes (Insausti & Lazzari, 1996, 2000; Barrozo *et al*, 2008) foram realizados com *T. infestans* e *R. prolixus*. Mediante o estudo das vias nervosas ocelares de *T. infestans*, foram descritas conexões diretas via neurônios de primeira ordem, com centros nervosos localizados no cérebro e diversos neurômeros da cadeia ganglionar ventral (Insausti & Lazzari, 1996). Os mesmos autores evidenciaram projeções nervosas provenientes de pêlos mecanoreceptores da cabeça de *T. infestans* no SNC e a partir dessas observações discutiram a função dessas sensilas da região ocelar da cabeça (Insausti & Lazzari, 2000). Barrozo *et al* (2008) descreveram o padrão das projeções dos neurônios sensoriais das antenas dentro do SNC de *R. prolixus*. Para outros insetos, há uma variedade de trabalhos que evidenciam projeções de receptores sensoriais do rostró, das antenas ou mesmo dos palpos, no SNC (Ignell & Hansson, 2005; Inoshita & Tanimura, 2006; Jorgensen *et al*, 2006; Ghaninia *et al*, 2007). Entretanto, projeções de neurônios sensoriais no SNC têm sido evidenciadas e descritas em uma grande quantidade de insetos (Schröter & Menzel, 2003; Ignell & Hansson, 2005; Inoshita & Tanimura, 2006; Ghaninia *et al*, 2007).

O estudo do SNC de insetos pode ser realizado através de diferentes técnicas: 1) técnicas gerais de coloração usando, por exemplo, hematoxilina-eosina; 2) técnicas específicas para o SNC, tais como injeções intravitais de azul de metileno e impregnações com prata; e 3) injeções intraneurais de tintas fluorescentes, enzimas e metais pesados. Cada tipo de técnica apresenta benefícios e limitações. As técnicas de coloração com prata reduzida, por exemplo, são muito robustas no que se refere à boa resolução e visualização de estruturas de gânglios, arborizações finas dos neurônios, conexões entre neurópilos e vias fibrosas. A limitação destas técnicas é que não permitem revelar a posição e forma de neurônios individuais (Mobbs, 1995).

Os estudos de neuroanatomia avançaram muito com o desenvolvimento das técnicas de injeção intracelular de corantes desenvolvidas durante a década de

1970, pois através destas técnicas é possível construir mapas das projeções centrais dos troncos nervosos periféricos com relativa facilidade. A injeção intracelular de corantes permite definir as distintas partes das células nervosas e estabelecer suas relações com outros neurônios e com os distintos centros do SNC. Além disto, é possível combinar a tintura com o uso quase simultâneo de eletrodos intracelulares, registrando a atividade elétrica de células individuais e estudando, subseqüentemente, detalhes da sua anatomia com a ajuda do microscópio óptico, confocal ou eletrônico (Hohensee et al, 2008).

A introdução do cloreto de cobalto como marcador intracelular e a demonstração do fato deste poder ser introduzido dentro dos neurônios, através do extremo cortado de seus axônios, tornou esta técnica de coloração uma ferramenta muito robusta para analisar as conexões dentro dos neuropilos dos gânglios de insetos (Pitman *et al*, 1972; Cohen *et al*, 1973). Para desenvolver esta técnica, os axônios podem ser "lesados" em ambos os extremos - periférico ou central. Deste modo, elegendo-se cuidadosamente o nervo a lesar, pode-se revelar a identidade dos neurônios identificados de maneira individual (Tyrer & Altman, 1974; Altman & Tyrer, 1977). Algumas das vantagens da técnica de difusão de cloreto de cobalto são: a) é uma técnica mais simples; b) os íons de cloreto de cobalto penetram pelas fibras mais finas dos neurônios, permitindo analisar com grande detalhe suas ramificações; c) os íons de cloreto de cobalto penetram na célula sem necessidade do uso de eletricidade; e d) as preparações podem ser analisadas como montagens inteiras ou secções, tanto ao microscópio óptico (MO), quanto ao microscópio eletrônico de transmissão (ME). Entretanto, a base fisiológica/funcional desta técnica é obscura, já que, por exemplo, não se conhece o mecanismo de transporte do cloreto de cobalto dentro das células.

Além dos metais pesados, outros marcadores importantes são os corantes fluorescentes (Hohensee et al, 2008) que podem ser conjugados com proteínas ou não. A aplicação de tais marcadores é freqüente e possui vantagens em relação à aplicação de metais pesados. Os corantes podem ser empregados em diversas combinações com comprimentos de onda diferentes que irão fazê-los fluorescer em distintas cores, de forma a colocar em evidência conexões neuronais existentes entre diferentes estruturas dentro de neuropilos do SNC. O uso destes corantes é muito vantajoso, pois permite reconstituir as estruturas neuronais em três dimensões

através da microscopia confocal, permitindo, assim, visualizar corretamente o arranjo de fibras, suas ramificações e conexões (Hohenssee et al, 2008).

Um dos corantes mais utilizados é a neurobiotina. Esta é uma amina derivada da biotina, que pode ser usada como marcador de neurônios. Comparada com outros corantes neuronais a neurobiotina resulta em um dos melhores pois é a mais solúvel, é iontoforética, não é tóxica e pode ser usada em amostras que serão fixadas com glutaraldeído e formaldeído. Normalmente, utiliza-se uma proteína fluorescente capaz de ligar-se à neurobiotina, permitindo, assim, a visualização das estruturas marcadas por esta.

Outro corante utilizado é a rodamina dextrana (dextran-rhodamine), que contém aminas livres e pode ser usada em amostras que serão fixadas com glutaraldeído e formaldeído. A dextrana é um polissacarídeo hidrofílico sintetizado por bactérias do gênero *Leuconostoc*. São inertes biologicamente, possuem alto peso molecular, boa solubilidade em água e baixa toxicidade (cf. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01800.pdf>). A rodamina-dextrana é usada numa ampla variedade de aplicações, incluindo marcação neuronal.

Diante da carência de estudos sobre a anatomia interna e externa do rostro e das projeções nervosas dos seus órgãos sensoriais dentro do SNC de triatomíneos, bem como da importância deste tipo de descrição para estudos funcionais, neste trabalho foram caracterizadas as projeções nervosas de algumas estruturas sensoriais no SNC de *R. prolixus*. Especificamente, foram descritas projeções de neurônios sensoriais do rostro e das antenas destes insetos, já que essas duas estruturas estão envolvidas na detecção de pistas sensoriais associadas com o hospedeiro. Além disto, neste trabalho também foi realizada uma caracterização dos tipos de receptores presentes no rostro de *R. prolixus*, bem como uma descrição da morfologia interna deste órgão.

1.9 Órgãos sensoriais envolvidos na percepção de pistas do hospedeiro

Os insetos apresentam diversos tipos de receptores sensoriais na superfície do corpo. Estes órgãos, por exemplo, detectam no ambiente as informações necessárias para que o SNC possa mediar efetivamente as diferentes etapas do processo de orientação ao hospedeiro e da alimentação. Essas etapas incluem desde a percepção até a aproximação e o contato com o hospedeiro (Bernard, 1970). Ou seja, estes receptores são a via de entrada de estímulos, i.e.,

informações, que serão exploradas durante a orientação ao hospedeiro a longa, média e curta-distância e, inclusive, após o contato.

Segundo Chapman (1998), o maior número de sensilas, unidades estruturais e funcionais básicas de recepção sensorial em insetos (Figura 6), encontra-se nas antenas. Do ponto de vista morfológico, existem vários tipos de sensilas, que freqüentemente apresentam diferentes funções sensoriais. Estes sentidos incluem a olfação, a gustação, o tato e a termo-higro-recepção, dentre outros. Cabe ressaltar que as células sensoriais que respondem à temperatura e umidade relativa estão usualmente juntas em uma mesma sensila termo-higroreceptora (Chapman, 1998). O número e a distribuição das sensilas nas antenas dos insetos apresentam um padrão característico para cada espécie. Estas características são muito utilizadas em estudos de taxonomia (Ismail & Hammond, 1968) e na determinação de relações específicas entre insetos e seus hospedeiros (Chapman, 1982; McIver, 1982). Porém, este caráter não parece confiável para todos os casos de identificação taxonômica. Chapman (2002) demonstrou que o número de sensilas pode variar entre indivíduos de uma mesma espécie dependendo das condições ambientais a que foram expostos durante o desenvolvimento.

Segundo Chaïka Slu (1980), os numerosos receptores presentes nas antenas de *R. prolixus* podem ser classificados em três categorias: mecanoreceptores (sensila caetica), olfativos (sensila tricóide, basicônica e coelocônica) e gustativos (sensila tricóide). Wigglesworth & Gillet (1934) descreveram que as antenas de *R. prolixus* são a principal estrutura sensorial para a percepção de estímulos térmicos. Posteriormente, Lazzari & Wicklein (1994) reafirmaram que nos triatomíneos os receptores de temperatura estão fortemente concentrados na antena, embora existam outros termoreceptores espalhados pelo corpo. Barth (1952) observou uma estrutura nas antenas de *T. infestans* que chamou "cova das cerdas" e para a qual Lazzari & Wicklein, 1994 propuseram uma função termoreceptora. Este órgão está localizado no terço distal do pedicelo, apresenta uma cavidade em forma de saco que se comunica com o exterior mediante um canal e é revestida por numerosas cerdas delgadas (Lazzari, 1983). Registros eletrofisiológicos mostram que a cova de cerdas não apresenta respostas ao ácido láctico, CO₂ ou ácido isobutírico. No entanto, esta estrutura é sensível a estimulação térmica (Lazzari & Wicklein, 1994). Sensilas coelocônicas com função termo-higro receptora são freqüentemente encontradas nas antenas de insetos e já foram descritas estruturas que

possivelmente possuem esta função para diversas espécies de triatomíneos (Bernard, 1974; Catalá, 1997).

É freqüente que as peças bucais dos insetos apresentem um alto número de sensilas capazes de responder a diversas modalidades sensoriais. Em insetos hematófagos a maioria dos receptores presentes nas peças bucais são quimio-receptores de contato, mecano-receptores e, naqueles providos de palpos, há também a presença de sensilas olfatórias (Chapman, 1998). Já foram descritos receptores mecânicos (sensila caética, sensila campaniforme), olfativos (tricóide) e gustativos (sensilas tipo "bastão" com poro) no rosto de triatomíneos (Bernard 1974, Catalá, 1996). Adicionalmente, também foram descritas sensilas coeloconicas em *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, que possivelmente teriam função termohigroreceptora (Catalá, 1996).

Os estiletes maxilares e mandibulares, que são estruturas revestidas de cutícula e localizadas dentro do rosto, também possuem células sensoriais. Em triatomíneos, cada estilete maxilar possui uma sensila que apresenta três células sensoriais com capacidade de mudar a sua freqüência de disparo de seus potenciais de ação frente a estímulos mecânicos e também, aparentemente, frente a variações de temperatura e umidade, mas não a estímulos químicos (Bernard, 1970; Pinet, 1970). Desta forma, os estiletes maxilares ao penetrarem nos tecidos provavelmente são capazes de avaliar as propriedades mecânicas (resistência, pulsação), bem como outras propriedades físicas. Já os estiletes mandibulares dos triatomíneos possuem em sua base 10 neurônios sensoriais, que também são capazes de responder a estímulos mecânicos (Bernard, 1970; Pinet, 1970). No entanto, assim como os estiletes maxilares, estes seriam incapazes de perceber estímulos químicos.

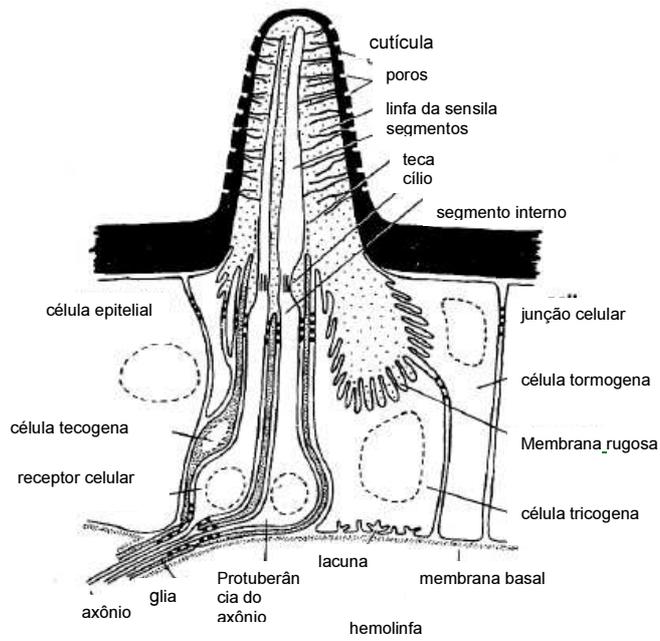


Figura 6: Desenho esquemático de uma sensila olfativa do tipo tricóide (adaptado de Kaissling, 1987).

2 Justificativa

A alimentação dos insetos hematófagos tem merecido a atenção de diversos pesquisadores em virtude do seu papel significativo na transmissão de agentes patógenos. Os aspectos estudados em relação à orientação ao hospedeiro nos triatomíneos contemplam até o presente trabalho desde a saída destes insetos do abrigo e a localização do hospedeiro, até a descrição de substâncias presentes na saliva que facilitam o processo de obtenção do alimento. No entanto, etapas e aspectos cruciais desta seqüência permanecem praticamente inexplorados. Primeiramente, em relação ao uso de abrigos pelos triatomíneos, há um único trabalho prévio realizado com *T. infestans*, não existindo estudos deste tipo para *R. prolixus*. Em relação à orientação ao hospedeiro à curta distância, as informações sobre os mecanismos que permitem aos insetos estimarem a distância de uma fonte térmica são ainda escassas e inconclusivas. Outro aspecto ainda não esclarecido é se os insetos utilizam outras pistas sensoriais, além do calor, na seleção de locais apropriados para picar. Finalmente, não há estudos funcionais sobre que tipo de receptores sensoriais estão presentes na probóscide de triatomíneos. Este tipo de estudo seria muito relevante para determinar se o rostro pode estar envolvido na detecção de pistas relevantes para escolha do local de picada.

Desta forma, este trabalho propõe esclarecer os mecanismos sensoriais e comportamentais relacionados com diferentes etapas da orientação ao hospedeiro e escolha do local de picada em triatomíneos. O conhecimento obtido através deste estudo permitirá auxiliar na compreensão da base sensorial e das estratégias relacionadas com a alimentação de *R. prolixus*.

3 Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Estudar a atividade espontânea, ou seja, na ausência de possíveis estímulos externos, de *R. prolixus* em associação com abrigos, bem como o efeito de pistas da presença de hospedeiros sobre o nível de atividade.

Analisar a capacidade de *R. prolixus* de avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor.

Avaliar os mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em *R. prolixus*.

Caracterizar as estruturas sensoriais do rostro de *R. prolixus* e suas projeções dentro do SNC.

3.2 Objetivos específicos

Descrever a atividade de saída e entrada de abrigos e de locomoção fora dos mesmos na ausência de sinais de hospedeiros;

Avaliar se a presença de pistas do hospedeiro é capaz de ativar a saída de abrigos e de aumentar a atividade locomotora;

Analisar o efeito do jejum sobre a atividade de saída e entrada de abrigos, assim como sobre a intensidade da atividade locomotora de *R. prolixus*, na ausência e na presença de pistas do hospedeiro;

Estudar a variação temporal das atividades de saída e entrada dos abrigos, bem como da atividade locomotora, na ausência e na presença de pistas do hospedeiro.

Avaliar se há uma distância em que a resposta de extensão da probóscide (PER) frente a fontes térmicas acontece com maior frequência.

Estudar os mecanismos pelos quais os triatomíneos determinam a distância a qual devem estender sua probóscide para picar fontes de calor.

Estudar se há influência da temperatura da fonte sobre a estimulação de distância do PER.

Caracterizar as pistas sensoriais responsáveis pela expressão do PER.

Analisar se a integração bilateral da estimulação térmica é necessária para guiar corretamente as tentativas de picada.

Avaliar se outros parâmetros do comportamento de picada, tais como frequência e duração, dependem da integração bilateral das informações detectadas pelas antenas.

Identificar sensilas e demais estruturas sensoriais presentes na superfície do último segmento rostral de *R. prolixus*.

Descrever a anatomia interna do rosto de *R. prolixus*.

Identificar no SNC as projeções nervosas originadas no rosto de *R. prolixus*.

Evidenciar no SNC possíveis áreas de integração nas quais há superposição de projeções nervosas sensoriais do rosto e das antenas de *R. prolixus*.

4 Materiais e métodos

4.1 Atividade de *R. prolixus* em associação com abrigos

4.1.1 Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos de uso de abrigo foram obtidos de uma colônia mantida no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou. A colônia de *R. prolixus* foi criada em frascos cilíndricos de acrílico, com 15 cm de diâmetro na base, altura de 20 cm e fundo forrado com papel de filtro. Dentro de cada frasco foi colocada uma tira de cartolina dobrada em forma de sanfona para aumentar a superfície interna e, posteriormente, frasco foi fechado com tecido de algodão. Os insetos foram mantidos em uma sala climatizada a 27 ± 2 °C e 60 ± 10 % de umidade relativa, e alimentados semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*). Nos ensaios foram utilizadas ninfas de 5º estágio com jejum de 21, 30 ou 60 dias, dependendo da série experimental.

4.1.2 Desenho experimental

Foram realizadas as seguintes séries experimentais para avaliar a saída e entrada dos insetos aos abrigos, assim como a sua atividade locomotora:

- a) sem hospedeiros presentes e com insetos com 21 dias de jejum pós-ecdise;
- b) sem hospedeiros e com insetos com 30 dias de jejum;
- c) sem hospedeiros e com insetos com 60 dias de jejum;
- d) com hospedeiros e com insetos com 21 dias de jejum;
- e) com hospedeiros e com insetos com 30 dias de jejum;
- f) com hospedeiros e com insetos com 60 dias de jejum.

Em cada uma das 6 séries experimentais desenvolvidas foram realizadas 6 repetições. Para cada ensaio foi utilizada uma arena experimental de vidro de 0,5 x 0,5 m com papel Kraft cobrindo o substrato. No centro da arena era colocado um abrigo de papelão para oferecer esconderijo aos insetos. O abrigo artificial consistia de 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 tipo de abrigo é adequado para triatomíneos, uma vez que, como já foi mencionado, estes insetos possuem marcada tigmotaxia e fototaxia negativa. A arena experimental foi colocada no interior de uma sala com temperatura e umidade monitoradas (24 ± 1 °C e 43 ± 8 % de UR) e sob ciclo de iluminação 12:12 L/E controlado por um temporizador. No final de cada ensaio o

abrigo (Figura 7) eo papel do substrato eram substituídos.

Como fonte de estímulos olfativos foram utilizadas duas fêmeas de camundongo (*Mus musculus*) de 1 mês de idade e entre 26-30 g de peso. Estes animais eram colocados dentro de uma pequena gaiola de aço de 10 x 10 x 10 cm que era suspensa através de um suporte, de forma que era mantida acima da arena experimental. A gaiola permanecia a 12 cm de altura do piso da arena e 8 cm de distância da parede lateral da mesma. Estas distâncias impediam o contato da cauda dos camundongos com a arena, evitando, assim, a transmissão de vibrações ao substrato onde era desenvolvido o experimento. Desta forma, os odores emitidos pelos camundongos atuavam como sinais da sua presença para os insetos.

Para cada ensaio, um grupo de 30 insetos era introduzido no interior da arena utilizando um pequeno recipiente, que era invertido para pô-lo em contato com o substrato e permitir a sua saída. Este procedimento era realizado três dias antes do início dos ensaios para permitir a aclimação dos insetos no ambiente e garantir que estivessem treinados com o regime de iluminação desejado. No final deste período, normalmente 100% dos insetos haviam entrado no abrigo. Na noite seguinte, a atividade dos insetos na ausência de sinais de hospedeiros era registrada mediante o uso de vídeo. Nestes ensaios era apresentada uma gaiola vazia como controle que tinha o objetivo de descrever o nível de atividade basal dos insetos. Na noite seguinte, os dois camundongos eram apresentados dentro da gaiola, a partir de um minuto antes do início dos ensaios, e a atividade dos insetos era novamente registrada em vídeo.

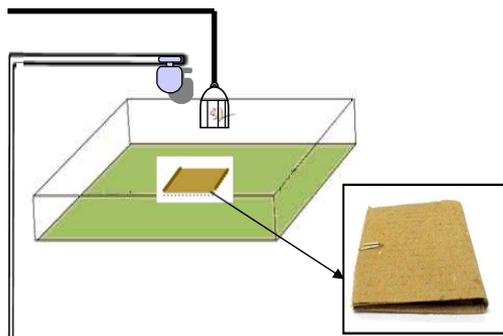


Figura 7. Desenho experimental para o estudo da atividade locomotora de triatomíneos em abrigos artificiais. À direita, um detalhe do abrigo artificial de papelão corrugado.

4.1.3 Registro e análise dos ensaios

Uma câmera de vídeo sensível à luz infravermelha tipo CCD (HDL) foi utilizada para registrar os ensaios. Esta foi montada sobre a arena e conectada a um vídeo-gravador (Philips, Brasil). Foi utilizado um painel de LEDs emissores de radiação infravermelha (IR, comprimento de onda de 900 nm), cuja luz não é percebida pelos insetos (Reisenman *et al*, 2002), a fim de permitir a filmagem em vídeo mesmo em escuridão total.

O registro da atividade dos insetos começava ao final do terceiro dia, aproximadamente dez minutos antes do apagado da luz e prosseguia por cinco horas consecutivas de escotofase. Os registros reiniciavam nos últimos 50 minutos de fase escura e terminavam após os 10 minutos iniciais da fotofase.

A imagem representada no monitor da televisão mostrava o abrigo e suas adjacências, de maneira que o registro da atividade dos insetos era feito para toda a área da arena (Figura 8). Para verificar se existia um efeito da presença dos odores de hospedeiro na atividade de saída e entrada ao abrigo e na atividade locomotora de *R. prolixus*, os seguintes parâmetros foram analisados:

- a) número de insetos que saíram do abrigo;
- b) número de insetos que entraram no abrigo;
- c) atividade locomotora.

Estes parâmetros foram registrados de maneira cumulativa para cada hora de ensaio para evidenciar quaisquer variações na atividade durante o período estudado. A atividade locomotora foi mensurada traçando sobre a imagem do monitor de TV um par de eixos ortogonais centralizados na tela e quantificando cada vez que um indivíduo cruzava qualquer uma das linhas da tela (Figura 8). Por saída do abrigo consideraram-se aqueles eventos em que um inseto colocara o corpo inteiro fora do esconderijo. De maneira semelhante, considerou-se uma entrada cada evento em que um inseto colocara o corpo inteiro dentro do abrigo.

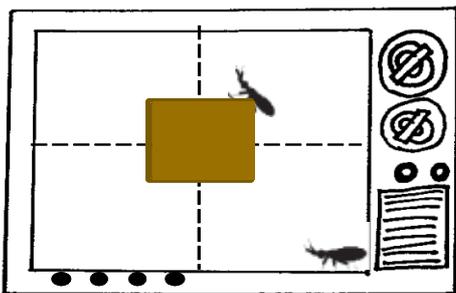


Figura 8. Desenho ilustrativo mostrando o par de eixos ortogonais desenhados na tela do monitor do aparelho de televisão utilizados para quantificar a atividade dos insetos.

4.1.4 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram processadas utilizando o programa *Statística* (versão 6). Para análise da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para comparação do número total de saídas espontâneas, ou seja na ausência de estímulos externos, do abrigo e comparação com os dados de saída de insetos na presença de pistas do hospedeiro foi utilizado o teste de Wilcoxon, com limite discriminante de $p < 0,05$. Este teste não paramétrico é usado para comparação dupla de dados pareados. Ressalta-se que foi realizado um balanço entre o número de saídas e entradas dos insetos no abrigo, ou seja, do número de saídas foi subtraído o número de entradas, isto porque o mesmo inseto podia entrar e sair várias vezes.

A fim de avaliar a influência de pistas do hospedeiro na atividade locomotora total dos insetos, foram comparados os dados obtidos nestas condições com aqueles nos quais a atividade dos insetos era espontânea. Primeiramente, fez-se uma proporção da atividade locomotora total de um determinado ensaio pelo número total de insetos que deixaram o abrigo naquele ensaio. Desta maneira, dividiu-se a atividade registrada por hora pelo número de saídas ocorridas naquele período, como método para comparar o nível de atividade apresentado de maneira mais independente do número de insetos ativos. O teste de Wilcoxon foi empregado na comparação destes valores.

Para avaliar a influência do jejum sobre a atividade de saída de insetos do

abrigo (balanço do número de saídas menos o número de entradas) e atividade locomotora total por inseto, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e, como pós-teste para comparação dos pares, o teste U de Mann Whitney.

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma colônia originária de Honduras e mantida no insetário do Laboratório de Neuroetologia do Instituto de Pesquisa sobre a Biologia de Insetos da Universidade François Rabelais (IRBI), Tours, França. Os insetos foram mantidos em frascos cilíndricos de polietileno numa sala climatizada com temperatura de 28 ± 2 °C e 60 ± 10 % de umidade relativa. Os triatomíneos foram alimentados por meio de um alimentador artificial através do qual lhes era oferecido sangue de carneiro heparinizado (1%).

Em todos os ensaios correspondentes a este capítulo utilizaram-se ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* com jejum pós-ecdise que variou entre 14 e 28 dias. Os ensaios foram realizados com insetos que eram descartados após finalização dos mesmos. A fim de evitar a orientação dos insetos por meio de pistas visuais, os seus olhos compostos foram cobertos com tinta acrílica preta pelo menos 24 horas antes dos ensaios (Flores *et al*, 2001). O comprimento das antenas e do rostro dos insetos foi medido com o auxílio de um microscópio estereoscópico para permitir a sua comparação com as distâncias registradas durante a expressão do PER.

Para avaliar a relevância da integração das informações recebidas pelas duas antenas, alguns insetos tiveram uma ou ambas as antenas cortadas. Os insetos antenectomizados tiveram sua(s) antena(s) retirada(s) pelo menos 24 horas antes dos ensaios. Uma ou ambas as antenas foram cortadas utilizando uma tesoura de microcirurgia. Ressalta-se que 50 % dos insetos utilizados nestes ensaios tiveram a antena direita amputada e os outros 50 % a antena esquerda. O corte se realizou na base da antena sobre a membrana que une o escapo ao tubérculo antenífero. Ao efetuar o corte observou-se, que em alguns casos uma pequena gota de hemolinfa surgia do tubérculo antenífero.

4.2 Estudo da capacidade de *R. prolixus* em avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor

4.2.1 Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma

colônia originária de Honduras e mantida no insetário do Laboratório de Neuroetologia do Instituto de Pesquisa sobre a Biologia de Insetos da Universidade François Rabelais (IRBI), Tours, França. Os insetos foram mantidos em frascos cilíndricos de polietileno numa sala climatizada com temperatura de 28 ± 2 °C e 60 ± 10 % de umidade relativa. Os triatomíneos foram alimentados por meio de um alimentador artificial através do qual lhes era oferecido sangue de carneiro heparinizado (1%).

Em todos os ensaios correspondentes a este capítulo utilizaram-se ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* com jejum pós-ecdise que variou entre 14 e 28 dias. Os ensaios foram realizados com insetos que eram descartados após finalização dos mesmos. A fim de evitar a orientação dos insetos por meio de pistas visuais, os seus olhos compostos foram cobertos com tinta acrílica preta pelo menos 24 horas antes dos ensaios (Flores *et al*, 2001). O comprimento das antenas e do rostro dos insetos foi medido com o auxílio de um microscópio estereoscópico para permitir a sua comparação com as distâncias registradas durante a expressão do PER.

Para avaliar a relevância da integração das informações recebidas pelas duas antenas, alguns insetos tiveram uma ou ambas as antenas cortadas. Os insetos antenectomizados tiveram sua(s) antena(s) retirada(s) pelo menos 24 horas antes dos ensaios. Uma ou ambas as antenas foram cortadas utilizando uma tesoura de microcirurgia. Ressalta-se que 50 % dos insetos utilizados nestes ensaios tiveram a antena direita amputada e os outros 50 % a antena esquerda. O corte se realizou na base da antena sobre a membrana que une o escapo ao tubérculo antenífero. Ao efetuar o corte observou-se, que em alguns casos uma pequena gota de hemolinfa surgia do tubérculo antenífero.

4.2.2 Desenho experimental

Com o objetivo de apresentar estímulos térmicos aos insetos de forma instantânea e rápida, foi desenhada uma fonte de calor *ad hoc*. A fonte térmica utilizada era constituída por uma pastilha de 5 x 5 cm, com efeito *Peltier* (Figura 9). O efeito *Peltier* baseia-se na teoria de que há um efeito aquecedor ou resfriador quando uma corrente elétrica passa por dois condutores (Bo, 2008). A tensão aplicada aos pólos de dois materiais distintos cria uma diferença de temperatura. Devido a essa diferença, o resfriamento *Peltier* faz o calor se mover de um lado ao outro da pastilha. Uma típica pastilha *Peltier* contém uma série de elementos

semicondutores do tipo-p e tipo-n, agrupados como pares (Figura 10), que agem como condutores dissimilares. Dito em outras palavras, um elemento *Peltier* pode ser definido como uma bomba de calor, pois transporta o calor de uma face da pastilha para a outra. Isso significa que este tipo de dispositivo tem um lado quente e outro frio (Bo, 2008). Logo, ao se aplicar uma tensão, uma face da pastilha aquece e a outra esfria.

A pastilha de alumínio utilizada nos ensaios era controlada por um termostato e um sensor, de temperatura eletrônico. Este sensor controlava a temperatura da pastilha e o termostato ajustava a corrente de alimentação em função disto para manter a temperatura constante. Enquanto a face da fonte de alumínio que era exposta aos insetos tinha a sua temperatura regulada no valor desejado, a face oposta era aderida a um dissipador de calor. Este último era constituído por uma placa de alumínio de 5 x 5 x 2 cm, e apresentava um canal interno acoplado a uma mangueira de silicone, que conduzia um fluxo contínuo de água para refrigerá-la. Sobre a face exposta do elemento *Peltier* foi fixado um sensor de temperatura conectado a um termômetro eletrônico, a fim de registrar a temperatura exata da fonte térmica a cada momento. Este sistema mantinha a face do elemento *Peltier* exposta aos insetos a 20 °C e, durante períodos específicos dos ensaios, permitia elevar, rapidamente, sua temperatura a 35 ou 40 °C. Os ensaios foram realizados numa sala com temperatura de $22,7 \pm 0,7$ °C.



Figura 9: Foto de uma pastilha com efeito *Peltier*, semelhante a utilizada nos ensaios. Foto extraída do site: www.jaderfranca.com/blog/wp-content/uploads/2008/08/peltier4.jpg.

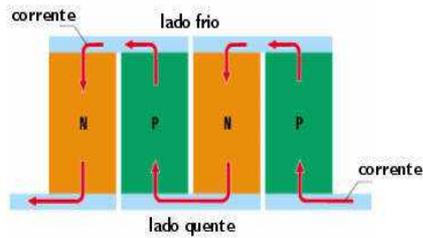


Figura 10: Esquema ilustrando o interior de uma pastilha com efeito *Peltier*. Foto extraída do site: www.ppgia.pucpr.br/~santini/ee/2007/1s/3/fig1.jpg

4.2.3 Arena experimental

Em alguns experimentos, foi utilizada uma arena retangular de acrílico (tamanho 12 x 5 x 3 cm) (Figura 11). Esta arena possuía uma abertura lateral onde a fonte térmica era apresentada aos insetos. O substrato da arena era coberto com papel de filtro para facilitar a locomoção dos insetos. Este papel era descartado ao fim de cada ensaio e, posteriormente, a arena era lavada. Para determinar a distância em que os insetos realizavam o PER, um pedaço de papel milimetrado de 5 x 5 cm era colocado sobre o fundo da arena na região adjacente à fonte térmica.

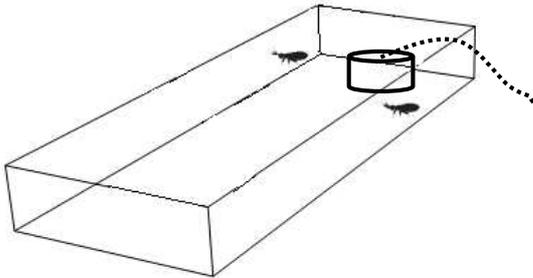


Figura 11 : Vista da arena experimental .

4.2.4 Ensaios com insetos intactos

a) Ensaios em condições de *closed-loop*

A fim de avaliar se o padrão de estimulação térmica gerado como consequência do deslocamento dos insetos é relevante para determinar a distância em que o PER é observado, foram realizados ensaios em condições de *closed-loop*.

Nestes ensaios, os insetos caminhavam livremente na arena experimental até chegar à fonte térmica. No início do experimento, um inseto era colocado dentro de um pote invertido de 3 cm de diâmetro localizado a 10 cm da fonte. O inseto permanecia neste recipiente por 5 minutos para se aclimatar às condições experimentais e, após este tempo, a temperatura da fonte era elevada. Subseqüentemente, o inseto era liberado na arena e o seu comportamento durante a trajetória até a fonte era avaliado. Foram realizadas duas séries a 35 e 40 °C para avaliar se o padrão de expressão do PER era modificado pela temperatura da fonte.

Uma grande proporção dos insetos apresentou o PER a 5 mm da fonte, mas devido ao desenho experimental era impossível determinar apenas através de observações diretas se, nessa condição, havia contato prévio das antenas com a fonte. Desta forma, uma série adicional foi desenvolvida para avaliar se os insetos contactavam a fonte com as antenas antes de realizar o PER a 5 mm. Para facilitar o registro e análise do comportamento, estes ensaios foram filmados utilizando uma câmera de vídeo sensível à luz infravermelha, conectada a um vídeo-gravador. A arena era iluminada utilizando um painel de LEDs infravermelhos que emitiam radiação de comprimento de onda de 900 nm. Segundo Reisenman *et al* (2002), luz destas características não é percebida pelos insetos. Os registros do comportamento foram pré-avaliados e somente aqueles em que os insetos realizaram PER a 5 mm da fonte de calor foram selecionados para a análise. Em todos esses ensaios, foi avaliado se os insetos tocavam a fonte com as antenas antes da extensão da probóscide.

b) Ensaios em condições de open-loop - distância fixa

A fim de avaliar se o padrão de PER seria semelhante em insetos mantidos a uma distância fixa da fonte térmica, e portanto desprovidos de qualquer informação gerada pela mudança no padrão de estimulação térmica devida ao próprio deslocamento, foram realizados ensaios em condições de *open-loop*. Nestes ensaios, os insetos foram suspensos pelo tórax com o auxílio de um pequeno suporte de alumínio que apresentava um pedaço de fita dupla face para aderi-los. Nesta posição, foi oferecida uma bola de isopor, de aproximadamente 1 cm de diâmetro e 0,05 g, aos insetos para que estes a segurassem com as patas e, desta maneira, mantivessem contato tarsal com um substrato (Figura 12). Este tipo de contato é importante para melhorar a aclimatização dos insetos. Após serem presos,

os insetos permaneciam cinco minutos na situação descrita, a fim de aclimatá-los às condições experimentais. Imediatamente, a temperatura da fonte era elevada e, a partir desse instante e durante os 50 segundos subseqüentes, era verificada a proporção de insetos que realizavam PER naquela distância específica. As distâncias testadas variaram de um em um milímetro entre 10 e 2 mm da fonte. Cada distância específica entre os insetos e a fonte de calor era medida desde o ápice da cabeça do inseto até a superfície da fonte. A seqüência em que as distâncias entre os insetos e a fonte eram testadas foi aleatória, i.e., o mesmo inseto foi testado em todas as distâncias, mas a ordem destas distâncias foi aleatória para cada indivíduo. Para avaliar a distância a partir da qual o PER poderia ser expresso, apenas a maior distância da fonte a qual o inseto fez o PER foi registrada. Foram realizadas duas séries experimentais nas quais a fonte foi apresentada a 35 e a 40 °C, para avaliar se havia influência da temperatura sobre a distância em que o PER era expresso.

Para comparar se a proporção de insetos que expressaram o PER em condições de *open-loop* e *closed-loop* era similar, foi feito um reagrupamento dos dados de frequência de PER em duas categorias distintas. Estas categorias foram: a) PER ocorridos entre 2 e 4 mm da fonte térmica; e b) PER ocorridos a distâncias superiores a 4 mm da fonte térmica.

c) Ensaios em condições de open-loop - distância dinamicamente variada

A fim de avaliar se o deslocamento do inseto é relevante na definição da distância em que o PER é realizado, foi desenvolvido um experimento em que insetos fixos eram aproximados gradualmente à fonte térmica pelo experimentador. Os insetos eram presos no suporte, conforme descrito, para os ensaios de distância fixa. Este suporte possuía um sistema de deslocamento tal que, quando acionado pelo experimentador, deslocava os insetos até a fonte a uma velocidade fixa e constante. A temperatura da fonte térmica era elevada antes do início da aproximação. A aproximação se iniciava a uma distância de 10 mm e era finalizada após o contato do inseto com a fonte, caso este não estendesse o rostro. Quando os insetos realizavam o PER durante o trajeto, registrava-se a distância na qual ocorria o mesmo e o ensaio finalizava. Nestes ensaios, também foram realizadas duas séries experimentais, apresentando a fonte térmica a 35 e a 40 °C, para avaliar se havia influência da temperatura sobre a expressão de PER.



Figura 12: Desenho experimental utilizado, mostrando o inseto suspenso pelo tórax frente a uma fonte térmica (adaptado de Flores, 2005).

4.2.5 Ensaios com insetos antenectomizados

Em todos os ensaios com os insetos antenectomizados optou-se por testar somente a fonte a 40 °C, já que resultados obtidos com os insetos intactos mostraram que a temperatura da fonte não afeta a expressão do PER.

a) Ensaios em condições de closed-loop

A fim de avaliar se integridade das antenas é importante na expressão do PER foram realizados ensaios com insetos antenectomizados unilateralmente em condições de *closed-loop*. A metodologia empregada foi a mesma utilizada para insetos com antenas intactas mantidos na condição de *closed-loop*.

Estes ensaios foram filmados e as fitas foram posteriormente analisadas. Foi computada apenas a maior distância na qual os insetos responderam ao calor apresentando um PER. Também foi observada a trajetória e o padrão de movimentação do inseto até a fonte de calor.

b) Ensaios em condições de open-loop

A fim de avaliar a relevância da integração bilateral da informação recebida pelas antenas na expressão do PER foram realizados ensaios com insetos

antennectomizados unilateral ou bilateralmente. Nestes ensaios, a distância do inseto à fonte foi mantida fixa. A metodologia empregada foi similar à utilizada para insetos intactos apresentados nas mesmas condições.

Para comparar se a proporção de insetos antennectomizados que expressam o PER em condições de *closed-loop* era similar em condições de *open-loop*, os dados foram reagrupados em duas categorias. Na primeira, foram agrupadas as distâncias entre 2 e 4 mm, na segunda, as demais distâncias. Nos ensaios em condições de *closed-loop* utilizaram-se somente os dados referentes a insetos que não tocaram a fonte com as antenas. Esta escolha foi devida ao fato de que em condições de *open-loop* os insetos antennectomizados não tocam a fonte com as antenas em nenhuma distância antes de expressar o PER. Assim, compararam-se dados em condições similares.

4.2.6 Papel do estímulo mecânico na expressão do PER

Foram realizados dois experimentos a fim de avaliar se estímulos mecânicos poderiam desencadear ou potencializar a expressão do PER.

a) Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos intactos

Primeiramente, foi realizado um estudo para avaliar se estimulação mecânica poderia afetar a expressão do PER. Neste experimento, insetos intactos eram confrontados com estímulos térmicos e mecânicos, simultaneamente. O estímulo mecânico constava de apresentação aos insetos de uma pinça de 15 cm mantida à temperatura ambiente. O experimentador colocava a pinça na frente do inseto, de forma que os mesmos podiam tocar a pinça com suas antenas. Em paralelo à apresentação do estímulo, a temperatura da fonte térmica era elevada a 40 °C. Durante a estimulação, os insetos eram mantidos em condições de *open-loop* a distância fixa. Baseado em ensaios anteriores (Figura 12), foram selecionadas algumas distâncias para os testes. Estas distâncias foram definidas de acordo com os seguintes critérios: a) não expressão de PER frente ao calor, i.e. 8 e 10 mm, b) baixa frequência de PER, i.e. 6 mm. O objetivo era verificar se a adição do estímulo mecânico geraria ou aumentaria a proporção de PER nestas distâncias.

b) Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos antenectomizados

A fim de avaliar se a integração bilateral das entradas térmica e mecânica é necessária para a expressão de PER, foi realizado um experimento com insetos antenectomizados unilateralmente. Estes ensaios foram conduzidos da mesma forma que os realizados com insetos intactos. No entanto, o estabelecimento das distâncias foi baseado nos ensaios realizados com insetos antenectomizados em condições de *open-loop* (Figura 21), e estas distâncias foram definidas de acordo com os seguintes critérios: a) não expressão de PER frente ao calor, i.e. 10 mm; b) baixa frequência de PER, i.e. 8 mm. Não se utilizou a distância de 6 mm como com os insetos com antenas intactas porque a taxa de PER, nesta distância, em resposta ao calor, era alta em insetos antenectomizados e, provavelmente, a co-utilização do estímulo mecânico, neste caso, não geraria um aumento relevante na resposta.

c) Apresentação do estímulo mecânico com insetos intactos

Para avaliar o papel do estímulo mecânico, como fator promotor da expressão de PER, foram realizados ensaios em que insetos intactos eram mantidos em condições de *open-loop*. Durante a realização dos ensaios, uma pinça de 15 cm apresentada a temperatura ambiente, era colocada na frente dos insetos, de forma que os mesmos podiam tocá-la com as antenas.

d) Apresentação do estímulo mecânico isoladamente em insetos antenectomizados

Com a mesma finalidade de avaliar o papel do estímulo mecânico como potencial fator capaz de promover a expressão do PER, também foi realizado um ensaio no qual foram testados insetos antenectomizados unilateralmente. Estes ensaios foram conduzidos da mesma forma que os realizados com insetos intactos.

4.2. 7 Análise estatística

Os aspectos comportamentais analisados estatisticamente foram: a) efeito da temperatura na expressão do PER; b) comparação da expressão do PER em insetos em *open* e *closed-loop*; e c) comparação da intensidade da expressão do PER quando o estímulo térmico foi apresentado isolado ou em simultâneo com o estímulo mecânico. Em todas estas análises, utilizou-se o teste de *Qui-quadrado* com limite

discriminante de $p < 0,05$, sendo que classes de dados com valores inferiores a 5 foram corrigidos pelo método de *Yates*.

4.3 Avaliação dos mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em *R. prolixus*

4.3.1 Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram retirados de uma colônia de *R. prolixus* originária de Honduras e mantida no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ-MG. Os insetos foram criados em uma sala climatizada a $27 \pm 2^\circ$ C e 60 ± 10 % de umidade relativa. Os triatomíneos foram mantidos em grupos dentro de frascos cilíndricos de polietileno com base de 15 cm de diâmetro e 19 cm de altura. O fundo dos frascos era forrado com papel de filtro para absorver as fezes e urina produzidas pelos insetos. Uma cartolina dobrada em forma de sanfona era disposta no centro do frasco, a fim de aumentar a superfície interna e facilitar a movimentação e alimentação dos insetos. A boca do frasco fechava-se com uma malha fina fixada com esparadrapo e elástico, que permitia a alimentação dos insetos em galinhas (*Gallus gallus*).

Nos ensaios, utilizaram-se, individualmente, ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, em jejum pós-ecdise de 30 a 45 dias. Os insetos foram descartados ao fim de cada ensaio. Os triatomíneos tiveram seus olhos compostos cobertos com tinta acrílica preta com no mínimo 24 horas de antecedência aos ensaios. Este procedimento foi realizado a fim de evitar que os insetos utilizassem pistas visuais durante os experimentos (Flores *et al*, 2001).

Os insetos que foram antenectomizados sofreram a amputação de uma ou ambas as antenas 24 horas antes dos ensaios. As antenas eram cortadas utilizando uma tesoura de dissecação (metade dos insetos teve a antena direita ou esquerda amputada). O corte era realizado na membrana que une o escapo com o tubérculo antenífero, na base da antena.

4.3.2 Fonte térmica

Nos ensaios foi utilizada a mesma fonte térmica desenhada por Ferreira (2004). Esta era constituída por uma placa de alumínio e um arame de níquel-cromo afixado

em posição central (300 μm de diâmetro, Figura 13) em relação à placa. O arame de níquel-cromo era isolado da placa de alumínio com o auxílio de uma membrana de látex colocada entre estes.

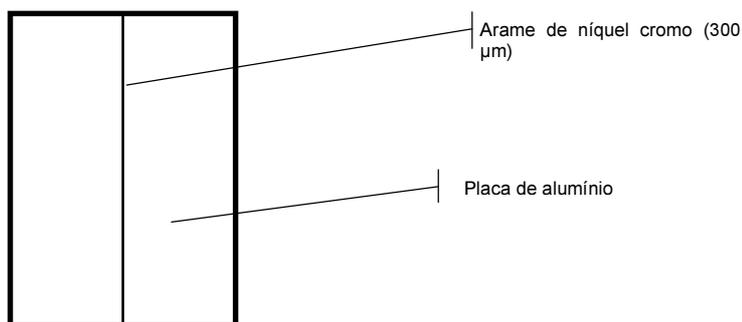


Figura 13: Desenho esquemático da fonte térmica constituída pela placa de alumínio e o arame de níquel-cromo.

Na face posterior da placa de alumínio foi fixada uma resistência elétrica plana, controlada por um termostato, de forma que a placa de alumínio permanecesse a uma temperatura estável semelhante a da pele de um hospedeiro. Uma segunda resistência regulável controlava a temperatura do arame de níquel-cromo. Ainda, as temperaturas da placa de alumínio (fonte térmica plana 33 °C) e do fio de níquel-cromo (fonte térmica linear 36 °C) foram monitoradas através de um termômetro digital de contato antes e após o término dos ensaios.

4.3.3 Experimento 1

Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar a distância à fonte térmica linear da primeira picada realizada pelos insetos. Para isto, utilizaram-se 4 grupos de insetos: insetos cuja antena esquerda foi cortada (N = 34), insetos cuja antena direita foi cortada (N = 34), insetos antenectomizados bilateralmente (N = 20) e insetos intactos (grupo controle, N = 34).

Para o presente experimento utilizou-se uma arena de acrílico retangular (10 x 1 cm), com uma abertura de 1 cm^2 na sua face inferior, localizada a 8 cm do receptáculo no qual os insetos ficavam presos e que dava acesso à fonte térmica. Os insetos eram colocados individualmente dentro do receptáculo e liberados após

10 minutos. A fonte térmica era colocada embaixo da arena, de forma que o arame de níquel-cromo permanecia em posição central e paralela ao eixo longitudinal da arena. O arame sempre foi alinhado de forma longitudinal para alinhá-lo com o eixo de deslocamento dos insetos. Isto permitiu verificar se as primeiras picadas dos insetos ocorriam do lado esquerdo ou direito da fonte térmica linear.

O fundo da arena era forrado com papel de filtro, sendo este papel descartado ao fim de cada ensaio. Nesse momento, a arena era lavada com água corrente e sabão neutro, para eliminar quaisquer compostos químicos depositados pelos insetos que poderiam ter sido adsorvidos nas paredes. A temperatura da face inferior da arena foi de 29 ± 1 °C. Todos os ensaios foram realizados em uma sala totalmente escura e com temperatura de 25 ± 2 °C.

4.3.4 Experimento 2

Estes ensaios foram realizados a fim de comparar o comportamento de insetos antenectomizados unilateralmente (N = 15) e insetos intactos (N = 14), frente à fonte térmica já descrita. Nestes ensaios foi avaliado o número total de contatos do rostro dos insetos com a fonte, o número de contatos prolongados, a distribuição dos contatos prolongados do rostro em função da distância à fonte térmica linear e a duração média dos contatos prolongados do rostro.

Para avaliação dos contatos prolongados do rostro, a fonte térmica foi coberta com uma membrana de látex. A membrana de látex era descartada ao fim de cada ensaio. O látex utilizado foi obtido a partir de luvas cirúrgicas descartáveis que foram colocadas em água destilada por cinco dias, sendo a água trocada diariamente, a fim de eliminar o talco.

Neste experimento foi utilizada uma arena de acrílico (comprimento 30 cm, largura 16 cm) similar a usada por Ferreira (2004). A arena apresentava uma peça de acrílico de 28 cm de comprimento que a atravessava perpendicularmente e estava localizada a uma distância de 10 cm da fonte térmica. Essa peça apresentava um compartimento cúbico central e a mesma funcionava como porta de correr (Figura 14). O cubo media 4 cm de lado e dentro dele era colocado um inseto que permanecia retido por dez minutos até o início do ensaio. Após esse tempo, a peça de correr era deslizada, permitindo, assim, a liberação do inseto. No fundo da arena havia uma abertura de 2 cm² que dava acesso à fonte térmica. Os procedimentos de preparação da arena experimental, assim como as condições

ambientais, foram idênticos às do experimento 1.

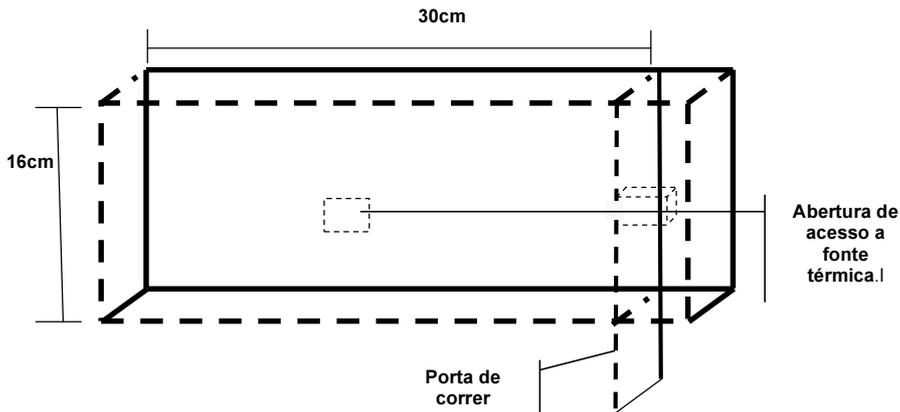


Figura 14: Desenho esquemático da arena experimental.

4.3.5 Registro e análise dos ensaios

Uma câmera de vídeo tipo CCD, que é sensível à luz infravermelha (marca HDL) foi utilizada para monitorar o comportamento dos insetos durante os ensaios. Esta foi montada sobre a arena e conectada a um vídeo-gravador do tipo *time-lapse*. Os ensaios foram iluminados utilizando um painel de LEDs, emissores de radiação infravermelha (IR, comprimento de onda de 900nm), cuja luz não é percebida pelos insetos (Reisenman *et al*, 2002).

No **experimento 1**, a filmagem teve início com a saída dos insetos do compartimento de liberação e prosseguiu por 40 minutos. Para a análise das fitas de VHS selecionaram-se trechos de 10 minutos da filmagem, com início a partir do primeiro contato do rostro dos insetos com a fonte térmica. Para medir a distância do ponto de contato do rostro em relação ao fio, a imagem da abertura da arena, onde era apresentado o estímulo térmico, foi projetada na tela de um monitor de TV. Esta imagem foi dividida arbitrariamente em 20 faixas de igual largura (correspondendo a faixas de 1mm na fonte), sendo 10 à direita e 10 à esquerda do seu centro, i.e., da fonte térmica linear. As repostas dos insetos antenectomizados foram comparadas com aquelas obtidas com insetos intactos no trabalho de Ferreira (2004). Os parâmetros comparados foram: a) número total de contatos do rostro por inseto; b)

tempo médio de contato do rostró com a fonte térmica; c) número de contatos prolongados do rostró, i.e. com mais de 1,5 s de duração; e d) distribuição dos contatos prolongados do rostró em função da distância à fonte térmica linear.

Nos ensaios do **experimento 2**, cujo objetivo era apenas avaliar o local da primeira picada dos insetos, somente foram filmados 10 minutos. Posteriormente, as fitas foram analisadas e foi determinado o local da primeira picada de cada inseto.

4.3.6 Análise estatística

Primeiramente, para avaliar a distribuição dos dados, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Então, como os dados não assumiram uma distribuição normal, utilizou-se em todas as análises estatísticas o teste de Mann-Whitney, com limite discriminante de $p < 0,05$. Foi realizada uma média ponderada para análise da distância dos contatos do rostró em relação à fonte térmica linear por considerar que os contatos do rostró de cada inseto são independentes entre si. O número de contatos do rostró em cada distância foi multiplicado pelo ponto médio correspondente de cada faixa, e. g., 0,5 mm para faixa 1, e assim por diante. Os produtos destas multiplicações foram somados e, em seguida, divididos pela soma total do número de contatos do rostró em cada faixa. Posteriormente, este valor ponderado foi usado nas análises estatísticas.

Para a análise do número de contatos prolongados do rostró, os dados foram normalizados em função do número total de contatos do rostró, ou seja, para cada inseto dividiu-se o número de contatos prolongados pelo número de contatos totais. Obteve-se, assim, um valor de contatos prolongados em razão do valor de contatos totais. Então, sobre este valor foi realizado o teste estatístico. Em relação a análise de contatos prolongados em função da distância a fonte térmica linear, os dados também foram normalizados. Neste caso dividiu-se o número de contatos prolongados ocorridos em cada faixa pelo número de contatos totais ocorridos naquela respectiva faixa. Este valor foi usado para realizar o teste estatístico.

4.4 Caracterização de estruturas sensoriais do rostró e antena de *R. prolixus* e suas projeções dentro do SNC

4.4.1 Insetos

Em todas as preparações, utilizaram-se adultos ou ninfas de 5º estágio de *R.*

prolixus. Estes insetos foram provenientes de uma colônia originária de Honduras e mantida no insetário do Laboratório de Neuroetologia do Instituto de Pesquisa sobre a Biologia de Insetos (IRBI), da Universidade François Rabelais, Tours, França. Os triatomíneos eram mantidos em uma sala climatizada com temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa de 60 ± 10 %, e submetidos a um regime de iluminação 12:12 L/E. Os insetos eram criados em frascos cilíndricos de polietileno, onde lhes era oferecido sangue de carneiro heparinizado em um alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990).

4.4.2 Receptores presentes no rostro de *R. prolixus*

a) Diafanização dos rostros

Foram feitas preparações do rostro de *R. prolixus* para descrever os tipos de sensilas presentes no último segmento rostral e, particularmente, a fim de verificar a existência de sensilas termorreceptoras. Para este procedimento utilizaram-se 4 insetos adultos machos. Para isso, cada inseto foi previamente resfriado dentro de um freezer por um minuto, a fim de imobilizá-lo. Posteriormente, o inseto foi colocado numa placa de Petri e, então, teve o seu rostro cortado, mediante um corte de bisturi realizado próximo à região basal desta estrutura. O rostro foi então transferido para um recipiente contendo solução de hidróxido de sódio 10 % e, subseqüentemente mantido a 60 °C por aproximadamente uma hora. De 15 em 15 minutos, o rostro era observado sob microscópio estereoscópico a fim de verificar se havia sido diafanizado. Após confirmar a diafanização, o rostro era retirado da estufa e transferido para um recipiente contendo solução de ácido acético. Este procedimento permitia neutralizar o alto pH gerado pelo hidróxido de sódio. A solução de ácido acético era preparada dissolvendo-se uma gota do ácido em 5 ml de água destilada.

Posteriormente, era realizada a desidratação dos rostros, colocando-os por 5 minutos em soluções de concentração crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) etílico. Finalmente, os rostros eram colocados sobre uma lâmina e o excesso de álcool era retirado. Uma gota do meio de montagem *Permout* (*PermoutTM Mounting Media*) era colocada sobre o rostro e, então, fixada sobre este uma lamínula. Após 48 horas, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico para buscar possíveis termorreceptores no rostro. O meio de montagem usado foi uma

resina sintética dissolvida em tolueno, que permite a conservação do material por longo tempo.

b) *Pesquisa de termorreceptores do rostro através de microscopia eletrônica de varredura (ME)*

Os rostros dos insetos foram preparados para serem analisados através de microscopia eletrônica de varredura. Foi utilizado o microscópio SEM, DSM 982 GEMINI, LEO, da escola de Medicina da Universidade François Rabelais, Tours, França. Iniciando as preparações, 4 insetos machos foram colocados dentro de um *freezer*, onde permaneceram por um minuto. Após a imobilização, os insetos tiveram os seus rostros retirados com ajuda de um bisturi através de um corte realizado próximo à região basal. Para preservar as estruturas externas, os rostros foram transferidos para um frasco contendo solução fixadora padrão à base de glutaraldeído (detalhes metodológicos descritos no anexo 1), onde permaneceram por 3 horas. O glutaraldeído é um bom fixador devido às suas propriedades de penetração e por precipitar prontamente substâncias protéicas, assegurando boa preservação de ultraestruturas. Posteriormente, as peças foram desidratadas colocando-as por 10 minutos em soluções de concentrações crescentes de uma série de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%). Subseqüentemente, as peças foram então mergulhadas em acetona por dez minutos para limpeza. As amostras foram montadas no suporte porta amostras do microscópio, considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e ao coletor de elétrons secundários. Para a colagem, foi usada uma cola condutora e este procedimento foi realizado sob microscópio estereoscópico. Posteriormente, as amostras foram levadas para uma câmara para impregnação com uma camada ultrafina de platina. Finalmente, as peças foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura para análise. A cobertura de materiais biológicos com tais metais visa torná-los bons condutores térmicos e elétricos.

4.4.3 Arranjo anatômico interno do rostro de *R. prolixus*

A fim de visualizar as estruturas internas presentes no rostro de *R. prolixus*, amostras deste órgão foram preparadas utilizando técnicas descritas por Ribi (1987). Para estas preparações, foram utilizados os rostros de 8 insetos adultos. Os insetos tiveram o rostro dissecado próximo à região basal, através de um corte de bisturi. O

rosto foi dividido em três segmentos: o primeiro, mais próximo da cabeça, o segundo, que compreende a região média, e o terceiro correspondente à região mais distal. Os três segmentos do rosto foram separados e colocados em frascos contendo solução fixadora à base de glutaraldeído (2,5 %) e formaldeído (2,0 %) em tampão fosfatado - pH 7,3 com glicose e CaCl_2 adicionados (solução descrita no anexo 1) - durante 3 horas. Prosseguindo, o fixador foi descartado e os rostros lavados 3 vezes com tampão padrão *Milloning's* (Millong, 1961, descrito no anexo 1). Posteriormente, os rostros foram fixados em solução à base de tetróxido de ósmio 1 % (solução descrita no anexo 1) por 1 hora. Neste momento, os frascos foram envolvidos com papel alumínio, evitando-se, assim, a exposição das amostras à luz. A solução de tetróxido de ósmio foi retirada dos frascos e substituída por tampão padrão *Milloning's*. Os preparados foram lavados 3 vezes com esse tampão e subseqüentemente desidratados em uma série crescente de soluções de álcool etílico. As amostras foram expostas por 5 minutos às soluções 70 e 80 %, por 10 minutos às soluções 95 % e 100 % e, novamente por 15 minutos, em um outro recipiente com álcool etílico 100 %. Então, o álcool foi retirado e substituído por uma mistura de 1:1 de óxido de propileno e álcool etílico 100 % por 15 minutos. Em seguida, essa mistura foi retirada e substituída por óxido de propileno puro que ficou em contato com as preparações por 20 minutos. Finalmente, essa substância foi retirada e substituída por uma mistura de 1:1 de *Durcupan* duro (Electron Microscopy Sciences, mais detalhes metodológicos no anexo 2) e óxido de propileno. Os frascos contendo os preparados foram abertos e mantidos sob agitação "over-night". Posteriormente, os rostros foram retirados dessa mistura e embebidos em *Durcupan* duro (detalhes metodológicos no anexo 2) por uma 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, os rostros foram colocados num molde contendo *Durcupan* duro, orientados sob microscópio estereoscópico e levados para dentro de uma estufa, onde permaneceram por 48 horas a 60 °C para a polimerização da resina.

Os blocos foram seccionados serialmente em cortes que variaram de 1,5-5 μm usando lâminas de vidro e navalha de diamante, em um micrótomo colocado sob um microscópio estereoscópico. Cada um dos cortes era acomodado em uma gota de água destilada sobre uma lâmina, com a ajuda de microscópio estereoscópico, pinça fina e um pincel. As lâminas eram, então, transportadas para uma placa quente, mantida a 60 °C, onde permaneciam por alguns segundos, de forma que os cortes

pudessem ser estirados e aderidos ao vidro. Os cortes foram montados nas lâminas obedecendo à seqüência em que foram obtidos. Posteriormente, foram adicionadas algumas gotas do corante azul de toluidina (Toluidine Blue–Basic Fuchsin EMS (cf. <http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/14950.aspx>) sobre a lâmina. Então, a mesma foi colocada por aproximadamente 1 minuto sobre a placa quente. Posteriormente, a preparação foi coberta com o meio de montagem Permout (*Permout TM Mounting Media*). Finalmente, os cortes foram observados sob um microscópio óptico em aumento de 10, 40 e 100 vezes (Olympus, Japan).

4.4.4 Projeções de receptores sensoriais no SNC de *R. prolixus*

a) Técnica de difusão de cloreto de cobalto

Para as análises das projeções rostrais e antenais no SNC foram realizadas difusões de cloreto de cobalto por estes apêndices. Foram realizadas 30 difusões pelo rostro de insetos adultos, sendo 10 difusões para cada um dos três segmentos rostrais dos insetos. Também foram realizadas 3 difusões pelo primeiro segmento rostral dos insetos adultos para verificar exclusivamente o posicionamento lateral das projeções dos receptores no SNC. Foram realizadas 5 difusões pelo rostro de ninfas de 5° estágio. Estas difusões foram realizadas somente pelo primeiro segmento do rostro, uma vez que tiveram apenas o objetivo de comparar as projeções encontradas com aquelas evidenciadas nos insetos adultos. Também foram realizadas 4 difusões pelas antenas de ninfas de 5° estágio, todas a nível do pedicelo. Finalmente, foram realizadas 3 difusões simultâneas pelas antenas e rostro, em insetos adultos. Nestas preparações, as difusões foram feitas pelo pedicelo da antena e pelo segundo segmento rostral.

Nas preparações, cujo objetivo era realizar cortes histológicos para detalhar as projeções de neurônios sensoriais no SNC, foram realizadas 10 difusões pelo segundo segmento do rostro de insetos adultos. Além disto, realizaram-se 20 difusões pelo pedicelo da antena e segundo segmento rostral, simultaneamente, em insetos adultos. E, finalmente, 2 difusões pelo pedicelo da antena em insetos adultos. As etapas da técnica constam de: a) aplicação, b) difusão, c) precipitação, d) fixação, e) hidratação, f) intensificação, g) desidratação, h) clareamento e montagem, e i) cortes histológicos

a) aplicação

Os insetos eram colados ventralmente numa placa de Petri utilizando cimento époxi. O extremo do rostro e/ou das antenas era cortado com a ajuda de um bisturi e, ao redor destas estruturas, era realizado um reservatório feito de vaselina. Em seguida, um capilar contendo água destilada era colocado em contato com o extremo lesado do apêndice por um minuto. Desta maneira, as células eram expostas a um choque osmótico e suas membranas celulares se rompiam. Posteriormente, a gota era seca com a ajuda de um papel toalha.

b) difusão

Uma gota de solução de cloreto de cobalto 0,25 % (solução descrita no anexo 3) era colocada no reservatório que, então, era coberto com uma camada de vaselina para evitar a evaporação da solução. Depois de transcorridas 3 horas de difusão, a zona era limpa com papel toalha.

c) precipitação

O inseto era submerso em solução de Ringer pH 7.0 (solução modificada de Case, 1957, descrita detalhadamente no anexo 3) e era iniciada a dissecação do sistema nervoso. A fim de precipitar o cloreto de cobalto dentro das células, era utilizada uma solução de sulfeto de amônia (solução descrita no anexo 3). Eram pingadas 5 gotas dessa solução sobre o sistema nervoso dissecado, de forma a cobri-lo totalmente durante 5 minutos. Após este período, toda a preparação era lavada com solução de Ringer, de forma a retirar a solução anterior.

d) fixação

O fixador à base de álcool etílico, ácido acético e formaldeído AAF (descrito no anexo 3) era aplicado sobre a preparação. Posteriormente, a preparação era completamente retirada e transferida para outro frasco contendo o mesmo tipo de fixador e mantida neste recipiente por 2 horas.

e) hidratação

O fixador era substituído por álcool 70%. A dissecação era terminada em álcool 70% retirando o sistema nervoso inteiro (cérebro e gânglios abdominais). Uma vez extraído o tecido continuava-se a hidratação com uma seqüência decrescente de soluções de álcool etílico 50 - 30 % - água destilada, 10 minutos em cada um. As preparações eram manejadas com uma pipeta de plástico para evitar a sua danificação.

f) intensificação

A preparação era transferida para uma placa de Petri contendo solução reveladora base (descrita no anexo 3) aquecida a 60 °C e, então, colocada em uma estufa escura por 1 hora. Posteriormente, transferiam-se as amostras em solução reveladora com prata (descrita no anexo 3) pré-aquecida a 60 °C e se levava novamente a estufa a 60 °C (Bacon & Altman, 1977). A cada 10 minutos a coloração das preparações era verificada com a ajuda de um microscópio estereoscópico. Somente quando esta atingia uma tonalidade marrom “tabaco” é que era retirada da estufa. Se fossem transcorridos 30 minutos e as amostras não alcançassem a cor, a solução reveladora de prata era renovada. Uma vez alcançada a cor, retirava-se o preparado e o colocava em água destilada pré-aquecida a 60 °C, por 10 minutos.

g) desidratação

Desidratava-se a preparação em série decrescente de álcool etílico 30 - 50 - 70 - 80 - 90 - 100 % X 2, cada um por 10 minutos.

h) clareamento e montagem

Clareava-se a preparação com metil salicilato durante 20 minutos. Após o clareamento, a preparação era colocada sobre uma lâmina escavada com o auxílio de um microscópio estereoscópico e era coberta com o meio de montagem *Permout*. Finalmente, uma lamínula era colocada e colada sobre a preparação. Após 48 horas, as preparações eram examinadas com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus B x 50, Japão). Algumas preparações foram colocadas no meio de montagem *Permout* e por capilaridade penetraram dentro de capilares de 1.10 mm de diâmetro interno. Posteriormente, tais amostras foram colocadas sob um microscópio estereoscópico (Leica, MZ6) e, então, foram analisadas as projeções laterais oriundas do rostro no SNC.

i) cortes histológicos

A técnica utilizada para montagem de cortes foi similar, até a etapa do clareamento, àquela desenvolvida para observação do SNC inteiro. Neste caso, após o clareamento das amostras em metil salicilato, esta substância era substituída por xilol e as amostras permaneciam neste por 10 minutos. Em seguida, se transferia a preparação para álcool 100 %, sendo que o álcool era trocado por 3 vezes. Em seguida, o terceiro volume de álcool era retirado e acrescentada uma mistura de 1:1 de álcool 100 % e óxido de propileno. A preparação ficava mergulhada nesta mescla por 15 minutos, sendo em seguida retirada a mistura e

acrescentado óxido de propileno puro. Subseqüentemente, o óxido de propileno era substituído por uma mistura de 1:1 de óxido de propileno e *Durcupan suave* (descrita no anexo 2). Neste momento, os frascos contendo as preparações eram abertos e mantidos sob agitação "over-night". Dando seqüência à técnica, os frascos eram abertos e deixados a 40 °C por 2 horas. Posteriormente, as amostras de sistema nervoso eram retiradas dos frascos e colocadas num molde contendo *Durcupan suave* por 1 hora, à temperatura ambiente. Transcorrido este tempo, os preparados eram colocados em moldes contendo *Durcupan suave*, orientados e levados a 60 °C por 48 horas, para a polimerização da resina.

Cortes de 20 micrômetros foram realizados com o auxílio de um micrótomo rotatório motorizado (RM 2055, Leica Jung) equipado com uma navalha de vidro, utilizando um microscópio estereoscópico (Leica, MZ6) para monitorar o processo. Ainda sob microscópio estereoscópico, os cortes eram acomodados delicadamente em gotas de água destilada sobre lâminas com a ajuda de uma pinça fina e um pincel. Subseqüentemente, as lâminas eram transportadas para uma placa quente mantida a 60 °C, onde permaneciam por alguns segundos de forma que os cortes pudessem ser estirados e aderidos ao vidro. Os cortes eram montados nas lâminas obedecendo a seqüência em que eram obtidos. Após uma lâmina ser completada, a lâmina era montada com *Permount*. Posteriormente, os cortes eram analisados ao MO (Olympus B x 50, Japão) e realizados desenhos esquemáticos de cada corte. Posteriormente, foi realizado um único desenho das projeções neuronais observadas.

b) *Preenchimento de neurônios com neurobiotina*

A fim de pôr em evidência projeções oriundas dos receptores sensoriais do rostró no SNC, foram realizadas 3 difusões de 1 % neurobiotina (NeurobiotinTM Tracer, Vector Laboratories, Burlingame, USA) em 0,25 M KCl, realizando um corte no segundo segmento rostral de insetos adultos. Posteriormente, o SNC era incubado em *Oregon-green Avidin* (Oregon Green[®] 488 conjugate A6374, Molecular Probes, OR, USA), que se ligava à neurobiotina, permitindo, assim, a visualização das estruturas marcadas por esta. A avidina é uma proteína conhecida pela sua capacidade de remover carboidratos. As etapas da técnica são descritas em detalhe a seguir.

a) aplicação

Os insetos eram imobilizados com cimento époxi, com o ventre para cima, numa placa de Petri. O apêndice a estudar era cortado transversalmente com a ajuda de um bisturi. Em seguida, ao redor do apêndice cortado, rostró ou antenas, era feito um reservatório de vaselina. A seguir, um capilar contendo água destilada era colocado em contato com o extremo do apêndice lesado, envolvendo-o com o líquido por um minuto. Após esse intervalo de tempo, o capilar era retirado, o resto da água seca com papel toalha e era colocada no reservatório uma gota de neurobiotina 1 % (solução descrita no anexo 4), que era coberta com vaselina para evitar sua evaporação. Posteriormente, a preparação era colocada dentro de uma caixa fechada para evitar a exposição à luz. Uma vez na caixa, a preparação era transportada para dentro de uma geladeira a 4 °C, onde permanecia por 48 horas.

b) fixação

Transcorrido este tempo, a preparação era retirada da geladeira, levada até um microscópio estereoscópico e a cabeça e tórax do inseto abertos, de forma a expor todo o SNC. Assim, o conjunto do SNC, i.e., cérebro e gânglios sub-esofágicos, torácico e posterior, era cuidadosamente retirado e transferido para paraformaldeído 4 % dissolvido em tampão *Milloning's* (descrito no anexo 1) e conservado na solução a 4 °C por 12 horas. Os frascos eram devidamente envolvidos com papel alumínio de forma a evitar a exposição à luz.

c) desidratação/reidratação (adaptado de Ignell *et al*, 2000)

Prosseguindo a técnica, a solução de paraformaldeído era retirada do frasco e o SNC era lavado 4 vezes em tampão *Milloning's* (descrito no anexo 1) previamente resfriado a 4 °C. Cada um das lavagens era realizada em tempos diferentes, dentro do intervalo de 12 horas. Posteriormente, era iniciada a desidratação do SNC utilizando uma seqüência crescente de exposição por 10 minutos em séries de álcool etílico de 50%, 60%, 70%, 96% e 100% - esta última por duas vezes. Após este procedimento, as preparações eram colocadas em óxido de propileno e álcool etílico (1:1) por 10 minutos e, subseqüentemente, em óxido de propileno puro por outros 10 minutos. Posteriormente, o SNC era reidratado utilizando todas as soluções citadas acima por igual tempo, porém na ordem inversa. Este procedimento de desidratação e reidratação foi realizado para tornar as membranas celulares mais permeáveis à entrada do *Oregon-green Avidin*.

d) incubação em Oregon-green-Avidin

A preparação era lavada em tampão *Millonig's* por 3 passagens de 10 minutos cada. Posteriormente, o tampão era retirado do frasco e a preparação era colocada em *Oregon-green-Avidin* com *Triton X* 0,2 % e 1 % de soro de proteína bovina BSA (solução descrita no anexo 4) e incubado por uma noite a 4 °C.

e) desidratação

O SNC era lavado em tampão *Millonig's* novamente por 3 passagens de 10 minutos. Então, o tampão era retirado e a preparação exposta por 10 minutos a cada concentração de uma seqüência crescente de soluções de álcool etílico: 70%, 90%, e 100% - esta última por duas vezes. Este procedimento de desidratação era realizado para permitir a posterior entrada do metil salicilato.

f) clareamento e montagem

Após a desidratação, a amostra era transferida para uma lâmina escavada, eliminado o excesso de álcool e recebida uma gota de metil salicilato que permanecia em contato com a preparação por 40 minutos para clarear o tecido. Em seguida, o metil salicilato era secado, uma gota de *Permount* era colocada sobre a amostra e uma lamínula era montada sobre a mesma. Os preparados eram guardados de maneira a evitar a sua exposição à luz. Após 48 horas, as lâminas eram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus B x 50, Japão) e eram feitas fotografias das mesmas para registro.

c) Preenchimento de neurônios com dextran rodamina

A fim de confirmar a posição das projeções oriundas dos receptores do rostro, observadas no SNC, através da técnica de injeção de neurobiotina, foram realizadas 5 difusões adicionais de injeção de *dextran rodamina* (Molecular Probes, Eugene, OR; USA, cf. <http://www.probes.com>; D-3308) no segundo segmento rostral de insetos adultos. O protocolo empregado na realização desta técnica foi muito similar àquele utilizado nas preparações com difusão da neurobiotina.

a) aplicação

Os insetos eram imobilizados com cimento époxi, com o ventre para cima, numa placa de Petri. O apêndice em questão era cortado com a ajuda de um bisturi. Em seguida, ao redor da estrutura cortada, rostro ou antenas, era feito um reservatório de vaselina. Dando seqüência a técnica, um capilar contendo água destilada era colocado em contato com o extremo do apêndice lesado, envolvendo-o

com o líquido por um minuto. Após esse intervalo de tempo, o capilar era retirado, o resto da água, seca, e era colocada no reservatório uma gota de rodamina (concentração desconhecida) que era coberta com vaselina para evitar a evaporação da substância. Posteriormente, a preparação era colocada dentro de uma caixa fechada para evitar a exposição à luz. Uma vez na caixa, a preparação era transportada para dentro de uma geladeira a 4 °C, onde permanecia por 48 horas.

b) fixação

Transcorrido este tempo, as preparações eram retiradas da geladeira, levadas até um microscópio estereoscópico e o cérebro e tórax abertos, de forma a expor todo o SNC. Assim, o SNC era retirado e transferido para um fixador à base de paraformaldeído dissolvido em tampão *Millonig's* (descrito no anexo 1), onde permanecia à temperatura ambiente por uma noite. Os frascos eram devidamente envolvidos com papel alumínio, de forma a evitar a exposição das amostras à luz.

c) desidratação

As amostras eram lavadas durante 15 minutos com tampão *Millonig's* (solução descrita no anexo 1). Este procedimento de lavagem era repetido 5 vezes. Finalmente, o tampão era retirado e iniciada a desidratação, expondo a preparação por 10 minutos a uma série decrescente de soluções de álcool etílico 30%, 50%, 70%, 95% e 100%. Este procedimento de desidratação era realizado para facilitar a posterior entrada do metil salicilato.

d) montagem

Após a desidratação, a amostra era transferida para uma lâmina escavada, o excesso de álcool era seco e acrescentada uma gota de metil salicilato que permanecia em contato com a preparação por 40 minutos para clarear o tecido. Em seguida, o metil salicilato era secado, uma gota de *Permount* era colocada sobre a amostra e montada uma lamínula sobre a mesma. Os preparados eram guardados de maneira a evitar a sua exposição à luz. Após 48 horas, as lâminas eram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus, Japan) e eram feitas fotografias das mesmas para registro.

5 Resultados

5.1 Atividade de *R. prolixus* associada ao abrigo

5.1.1 Atividade de saída de abrigo

Primeiramente, analisou-se a atividade espontânea de saída de abrigos. E, a fim de avaliar se a presença de odores do hospedeiro é capaz de promover um incremento nessa atividade, a dinâmica de saída das ninfas em ambas as condições foi comparada. Esta comparação foi realizada para cada nível de jejum separadamente, i.e., com insetos com 21, 30 e 60 dias de jejum.

A atividade de saída do abrigo em insetos com 21 dias de jejum foi baixa, tanto na ausência quanto na presença de pistas do hospedeiro (Figura 15). Em insetos com 30 dias de jejum, houve baixa atividade espontânea de saída de abrigo, mas na presença de pistas do hospedeiro esta atividade aumentou significativamente (Figura 15, Wilcoxon, $p < 0,03$). Da mesma forma, em insetos com nível de jejum de 60 dias também houve baixa atividade de saída espontânea dos insetos dos abrigos e maior frequência de saída de insetos em presença de estímulos do hospedeiro (Figura 15, Wilcoxon, $p < 0,04$).

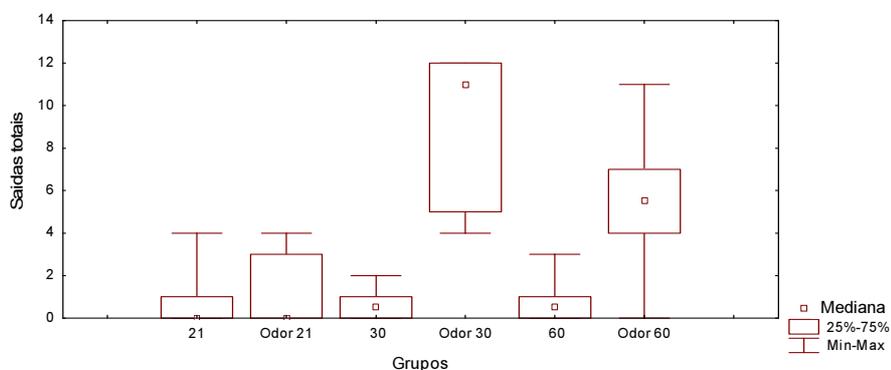


Figura 15. Comparação do número total de insetos que saíram do abrigo na ausência e na presença de pistas do hospedeiro (21, 30 e 60 dias de jejum), 6 ensaios realizados em cada série.

5.1.2 Atividade locomotora em *R. prolixus*

A atividade locomotora espontânea dos insetos foi analisada e comparada à observada nos ensaios em que sinais do hospedeiro foram apresentados. Estas comparações foram realizadas separadamente para os diferentes níveis de jejum testados, i.e., 21, 30 e 60 dias. A comparação da atividade espontânea e da atividade observada na presença de odores de camundongo em insetos com 21 dias de jejum não apresentou diferença significativa (Figura 16, Wilcoxon, n.s). Entretanto, insetos com 30 dias de jejum mostraram uma atividade significativamente maior na presença de odores de camundongo (Figura 16, Wilcoxon, $p < 0,03$). Da mesma forma, em insetos com 60 dias de jejum foi observada uma atividade locomotora significativamente aumentada frente aos estímulos emitidos pelos hospedeiros (Figura 16, Wilcoxon, $p < 0,04$).

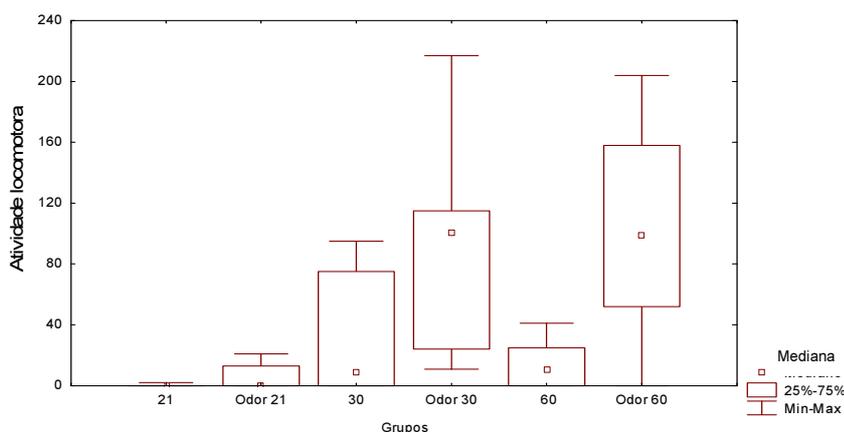


Figura 16 Comparação da atividade locomotora de insetos na ausência e na presença de pistas do hospedeiro (21,30 e 60 dias de jejum), 6 ensaios realizados em cada série.

5.1.3 Efeito do jejum sobre a atividade de *R. prolixus*

a) Saída do abrigo

A fim de avaliar se o nível de jejum afetaria a atividade espontânea de saída de abrigos, foi comparado o número de saídas em insetos com 21, 30 e 60 dias de jejum. Posteriormente, também foi comparado o número de saídas observadas na presença de pistas do hospedeiro nos diferentes jejuns. O nível de jejum não afetou

significativamente a atividade de saída espontânea do abrigo de ninfas de *R. prolixus* (Figura 15, Kruskal-Wallis, n.s). Contudo, na presença de odores do hospedeiro, o aumento do jejum promoveu um aumento significativo na atividade de saída de abrigos (Figura 15, Kruskal-Wallis $p < 0,01$). Na presença do hospedeiro, os insetos com 30 ou 60 dias de jejum apresentaram uma atividade de saída significativamente maior do que com 21 dias de jejum (Figura 15, teste U de Mann Whitney, $p < 0,01$ e $p < 0,02$, respectivamente). Por outro lado, ninfas com 30 e 60 dias de jejum não apresentaram diferenças significativas entre si em relação com esta atividade (Figura 15, U de Mann Whitney, n.s).

b) *Atividade locomotora*

A fim de avaliar se o nível de jejum afeta a atividade locomotora dos triatomíneos, a mesma foi comparada nos insetos em 21, 30 e 60 dias de jejum. A atividade também foi comparada na presença de pistas do hospedeiro em insetos com esses mesmos níveis de jejum. O aumento do jejum pareceu promover certo incremento na motivação para locomoção espontânea, porém esta diferença não foi significativa (Figura 16, Kruskal-Wallis, n.s). Entretanto, na presença de sinais do hospedeiro, os diferentes níveis de jejum testados promoveram uma variação significativa na atividade locomotora dos insetos (Figura 16, Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Adicionalmente, a comparação dos resultados obtidos nestas condições em insetos com 21 e 30 dias de jejum mostrou um aumento significativo da atividade locomotora dos últimos (Figura 16, U de Mann Whitney, $p < 0,01$). De maneira semelhante, a atividade locomotora dos insetos testados na presença do hospedeiro e com 60 dias de jejum foi significativamente maior do que a apresentada pelos insetos com jejum de 21 dias (Figura 16, U de Mann Whitney, $p < 0,01$). Por outro lado, insetos com 30 e 60 dias de jejum não mostraram uma diferença significativa na sua atividade locomotora na presença do hospedeiro (Figura 16, U de Mann Whitney, n.s).

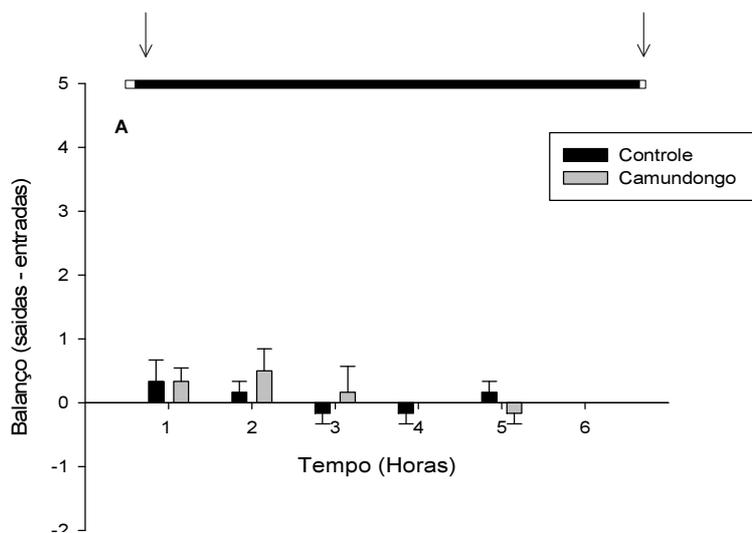
5.1.4 Padrão temporal de atividade de *R. prolixus*

a) *Atividade de saída/entrada de insetos nos abrigos*

A fim de avaliar se os insetos apresentavam um horário preferencial de saída dos abrigos, a variação temporal do número de saídas espontâneas foi comparada. Posteriormente, a variação do mesmo parâmetro foi analisada na presença de pistas

do hospedeiro. Na série com insetos em 60 dias de jejum, a atividade de saída de insetos dos abrigos foi drasticamente maior na primeira hora da escotofase (Figura 17 C). Entretanto, observa-se que, para os outros níveis de jejum testados, na ausência ou na presença de pistas do hospedeiro, os insetos não apresentaram uma preferência em deixar os abrigos nas primeiras horas da escotofase (Figuras 17 A, B, C).

É importante ressaltar que, em todos os ensaios realizados, a maioria dos insetos não retornou ao abrigo, sobretudo na presença de sinais do hospedeiro (Figura 17 A, B, C). Contudo, os insetos mostraram uma tendência a retornar ao abrigo somente no final da fase escura (Figura 17 A, B, C).



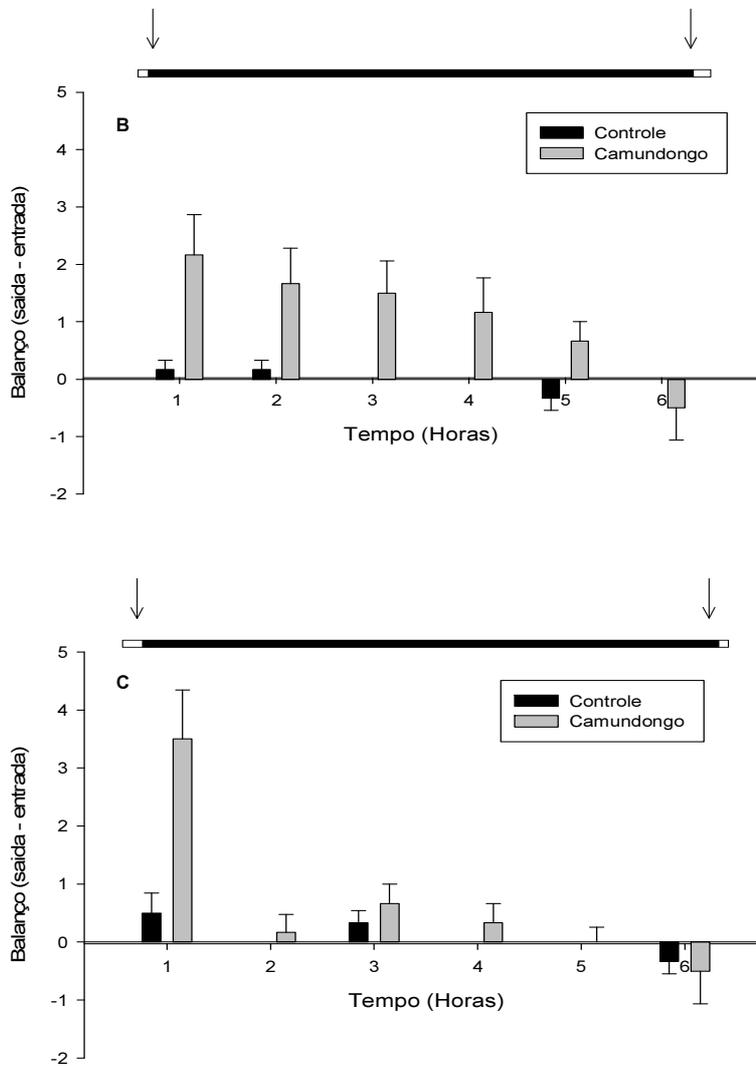
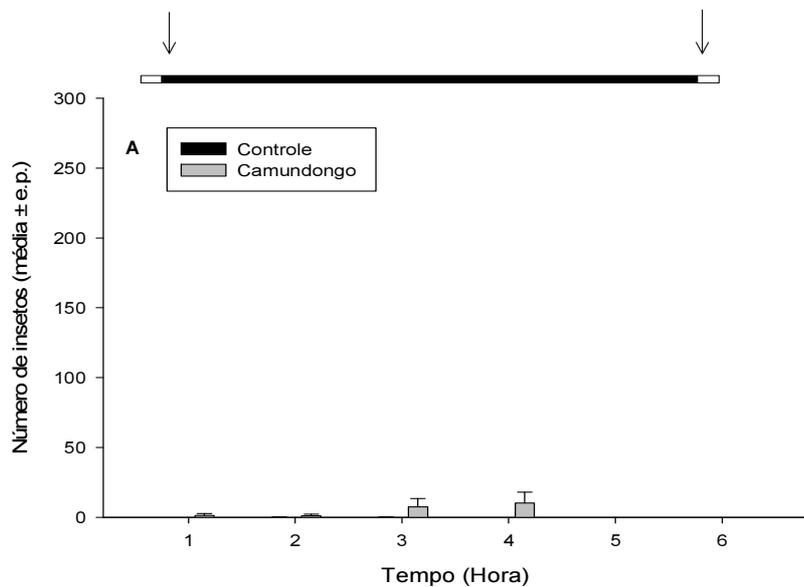


Figura 17. Variação temporal do balanço da atividade de saída e entrada ao abrigo. A: insetos com 21 dias de jejum; B: insetos com 30 dias de jejum; C: insetos com 60 dias de jejum. Barras pretas: balanço da atividade na ausência de sinais do hospedeiro. Barras cinzas: balanço da atividade na presença de sinais do hospedeiro. Os valores representam a média de seis réplicas por série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase; setas/início e fim da escotofase.

b) *Atividade locomotora*

Em insetos mantidos em jejum de 21, 30 e 60 dias a atividade locomotora na ausência do hospedeiro foi extremamente baixa, não havendo nenhum período específico que apresentasse um pico de locomoção dos insetos (Figura 18 A, B, C). Ainda, na presença do hospedeiro, os insetos em jejum de 21 dias também mostraram uma atividade locomotora extremamente baixa. Entretanto, quando o jejum estendeu-se a 30 e 60 dias, a atividade locomotora apresentada pelos insetos na presença do hospedeiro foi bastante intensa.



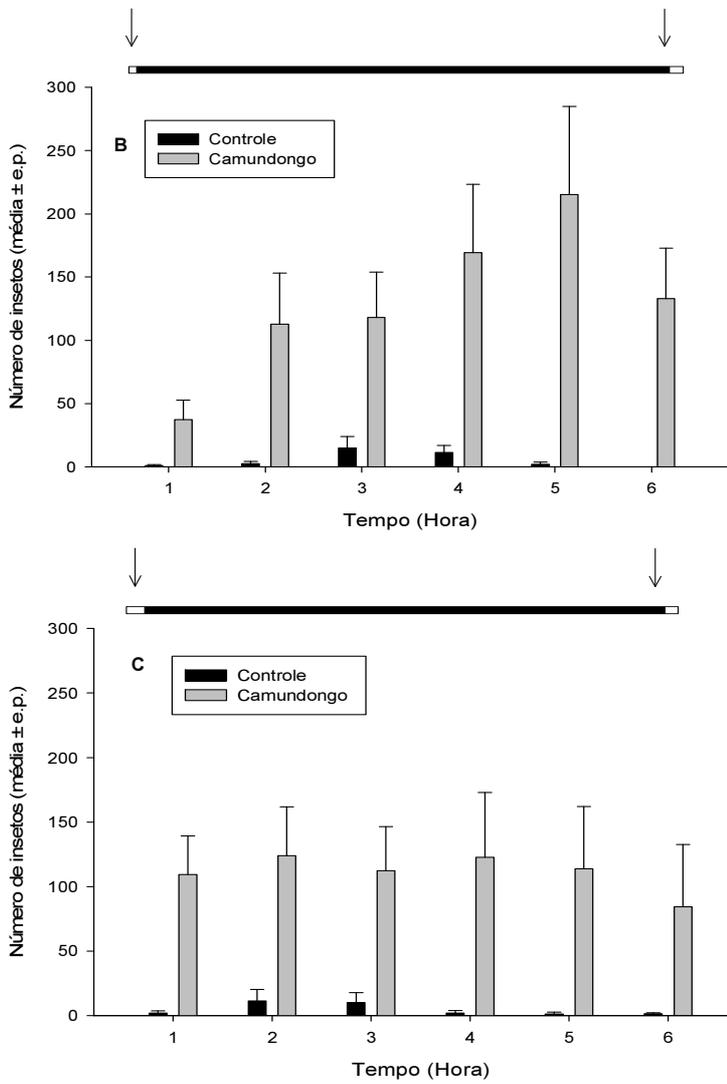


Figura 18. Atividade locomotora espontânea (barras pretas) e na presença de sinais do hospedeiro (barras cinzas) em ninfas de *R. prolixus*. A: insetos com 21 dias de jejum; B: insetos com 30 dias de jejum; C: insetos com 60 dias de jejum. Os valores graficados representam a média de seis réplicas por série. A barra superior representa o ciclo de iluminação: branco/fotofase; preto/escotofase; seta/início e fim da escotofase.

5.2 Capacidade de *R. prolixus* em avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor

5.2.1 Variação da expressão do PER em função da distância à fonte térmica

A fim de determinar o intervalo de distância em que é mais freqüente observar PER frente a uma fonte térmica, foram realizadas 6 séries de ensaios em diferentes condições experimentais.

5.2.2 Insetos intactos em condições de *closed-loop*

Primeiramente, utilizando insetos que caminhavam livremente até a fonte, i.e., em condições de *closed-loop*, foi avaliada a distância à qual estes expressavam o PER. Nestes ensaios, observou-se que 100 % dos insetos testados apresentaram PER frente à fonte. Ainda foi verificada uma variação na freqüência do PER em função da distância à fonte térmica (Figura 19). Os insetos expressaram o PER a partir de 10 mm de distância da fonte térmica. Entretanto, observa-se que, durante a aproximação à mesma, houve uma maior proporção de insetos que realizaram o PER a 5 mm da fonte e que a esta freqüência diminui, tanto a distâncias maiores como menores (Figura 19).

As antenas de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* têm em média 5 mm de comprimento, de maneira que, a partir de uma distância equivalente, poderiam tocar a fonte, inclusive antes do inseto expressar o PER. Sendo assim, levantou-se a hipótese de que o aumento na freqüência do PER a 5 mm da fonte poderia ter ocorrido devido ao contato prévio das antenas dos insetos com a mesma. A fim de avaliar a proporção de insetos que tocam a fonte com suas antenas antes de realizar o PER a 5 mm foi feito um experimento *ad hoc*. Isso foi necessário, uma vez que a determinação a olho nu da proporção de insetos que tocavam a fonte com as antenas à distância de 5 mm antes de realizarem o PER era imprecisa. No novo experimento, foi determinada a proporção de insetos que contactavam a fonte antes de estender a probóscide à distância de 5 mm. Nestas condições, 70,6 % dos insetos não tocaram a fonte com as antenas antes de fazer o PER (Figura 20).

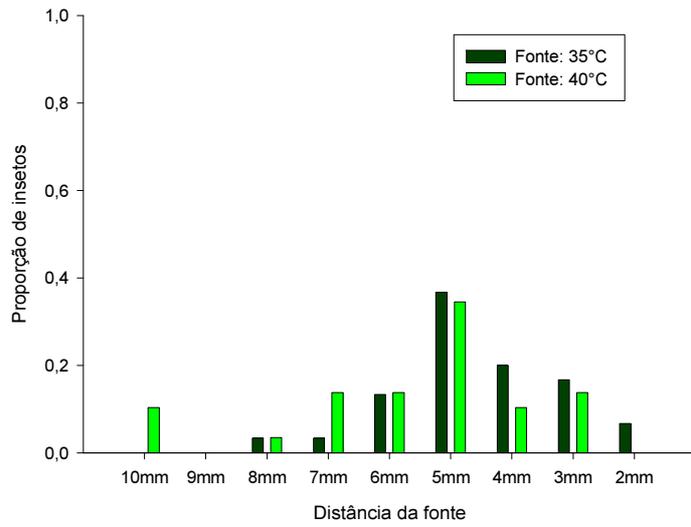


Figura 19: Proporção de insetos que apresentaram o PER em função da distância à fonte térmica. Condições de *closed-loop*. Série com a fonte a 35°C, N= 30 insetos. Série com a fonte a 40°C, N= 29 insetos.

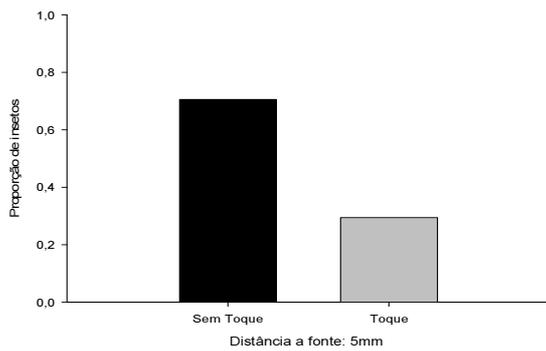


Figura 20: Proporção de insetos que tocaram a fonte térmica com as antenas antecipando o PER à distância de 5 mm. Condições de *closed-loop*, fonte a 40°C. N= 17 insetos.

5.2.3 Insetos intactos em condições de *open-loop*

Posteriormente, foi testado se insetos mantidos em condições de *open-loop* expressariam o PER de forma semelhante ao observado na série anterior. Para isto, foram realizadas duas séries experimentais com os insetos mantidos nessas condições.

a) *Ensaio de distância fixa*

Nesta série, a distância entre o inseto e a fonte térmica foi mantida fixa. O parâmetro avaliado foi a distribuição de frequência de PER em função da distância e apenas a máxima distância da fonte à qual o inseto apresentou um PER foi registrada. Observou-se que 76 e 68 % dos insetos realizaram o PER nos ensaios em que a fonte foi mantida a 35 e a 40 °C, respectivamente. Cabe salientar que para as análises de distribuição de distância somente foram considerados os insetos que realizaram o PER.

O PER ocorreu com maior frequência a distâncias menores do que na série realizada em *closed loop* (Figura 21). Nestas condições experimentais, os insetos conseguiam tocar a fonte com suas antenas somente a partir de 4 mm, apesar desses órgãos terem 5 mm de comprimento. A impossibilidade de haver contato das antenas com a fonte a 5 mm deve-se ao fato dos insetos, nestas condições, posicionarem as suas antenas com uma maior abertura angular quando se encontram perto da fonte (Flores, 2005). Também foi observado que, a partir da distância de 4 mm da fonte e, subseqüentemente, em todas as distâncias menores do que esta, o toque das antenas na fonte sempre antecedia a expressão do PER. Cabe ressaltar que o comprimento do rostro é de aproximadamente 3 mm.

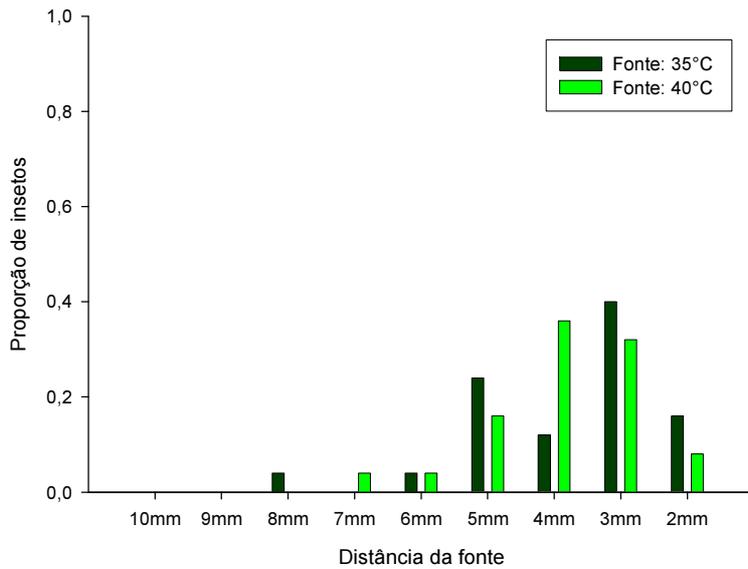


Figura 21: Proporção de insetos que apresentaram o PER em função da distância à fonte térmica. Os ensaios foram realizados em condições de *open-loop*. N= 25 insetos em ambas as séries.

b) Ensaios de distância dinamicamente variada

Uma terceira série experimental foi realizada para avaliar se a aproximação artificial, i.e., o deslocamento manual dos insetos suspensos até a fonte térmica, poderia alterar o perfil de distâncias em que o PER seria expresso. Cabe ressaltar que durante a aproximação manual 77 % dos insetos realizaram o PER quando a fonte foi apresentada a 35 °C. Quando a fonte foi apresentada a 40 °C, essa porcentagem foi de 67 %. Da mesma forma que na série anterior, somente foram incluídos na análise os insetos que realizaram este comportamento. Além disso, somente foi registrada a máxima distância da fonte em que o inseto expressou o PER. Durante a aproximação manual, o perfil de expressão do PER em função da distância foi semelhante ao observado na série anterior (Figura 22). Porém, houve uma menor dispersão dos dados que se concentraram ao redor da distância de 3 mm, ou seja, os insetos realizaram o PER somente após contatar a fonte térmica

com as antenas.

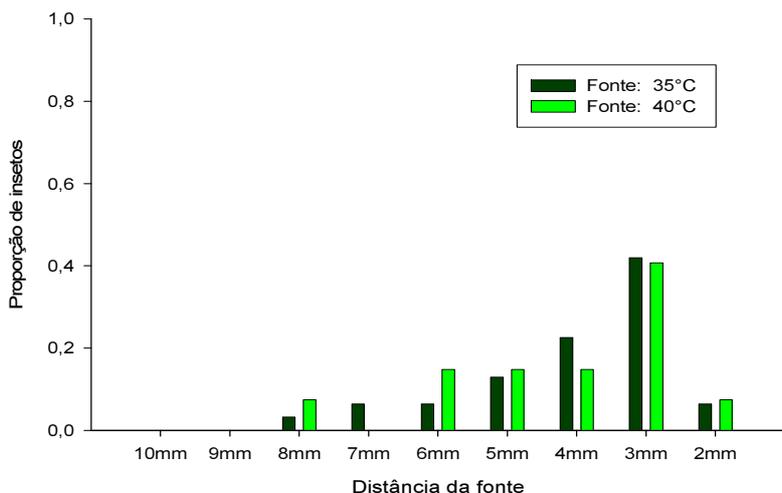


Figura 22: Proporção de insetos que apresentaram o PER em função da distância à fonte térmica durante a sua aproximação manual. Os ensaios foram realizados em condições de *open-loop*. Série com a fonte a 35°C, N= 31 insetos. Série com a fonte a 40 °C, N= 27 insetos.

5.2.4 Comparação entre os dados nas condições de *closed-loop* vs *open-loop*

A fim de certificarmos se a atividade locomotora dos insetos era necessária para estimar a distância à fonte e, conseqüentemente, para disparar o PER no local adequado, foram comparados os dados obtidos em condições de *closed* e *open-loop* nas duas temperaturas testadas. Os dados relativos à freqüência de expressão do PER foram agrupados em duas categorias para realização das análises estatísticas: a) PER ocorridos entre 2 e 4 mm e, b) PER ocorridos a partir de 4 mm. Adicionalmente, compararam-se os dados obtidos em *open-loop* distância fixa com aqueles obtidos em *open-loop* distância variada nas duas temperaturas testadas. Constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do PER entre as séries *open-loop* distância variada e *open-loop* distância fixa realizadas a 35 °C (*Qui-quadrado* n.s). Coincidentemente, também não houve uma diferença significativa entre estas séries a 40 °C (*Qui-quadrado*, n.s). De maneira

semelhante, os dados obtidos em condições de *closed-loop* foram comparados com aqueles de condições de *open-loop* distância fixa (realizados a 35 °C) e não foi observada diferença estatisticamente significativa (*Qui-quadrado*, *n.s*). Por outro lado, a comparação dos dados das séries em *closed* e *open-loop* a distância fixa (realizadas a 40 °C) permitiu constatar uma diferença significativa (*Qui-quadrado*, $p < 0,01$). Finalmente, a comparação dos dados da série realizada em condições de *closed-loop* com aqueles da série em *open-loop* distância variada mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre as séries a 35 e a 40 °C (*Qui-quadrado* $p < 0,03$ e $p < 0,003$, respectivamente).

5.2.5 Efeito da antenectomia na expressão do PER

A fim de avaliar se a integridade das antenas é relevante para a determinação da distância em que o PER é realizado pelos insetos, foi desenvolvido um novo experimento *ad hoc*.

a) Insetos em condições de *closed-loop*

Primeiramente, foi realizada uma série de ensaios em condições de *closed-loop* nos quais insetos antenectomizados unilateralmente foram confrontados com uma fonte térmica a 40°C. Percebeu-se que a proporção de insetos que realizaram PER frente à fonte térmica foi similar à observada com insetos intactos nas mesmas condições experimentais. Durante a trajetória dos insetos até a fonte, muitos deles tocaram alguma superfície da arena com a sua antena intacta. Nesse momento, os insetos alteravam imediatamente a sua trajetória para o lado contatado e tentavam picar essa superfície. Nestas condições, foi possível observar que aproximadamente 50 % dos insetos tocaram uma superfície fria com a antena intacta imediatamente antes de realizar o PER (Figura 23). Além disto, aproximadamente 40 % dos insetos fizeram PER sem tocar nenhum objeto presente no ensaio com a antena. O restante dos insetos, ou seja 10%, fizeram PER após tocar a fonte térmica com a antena. Cabe ressaltar que em todos os ensaios a arena foi mantida à temperatura ambiente e, portanto, as suas paredes não apresentavam estimulação térmica.

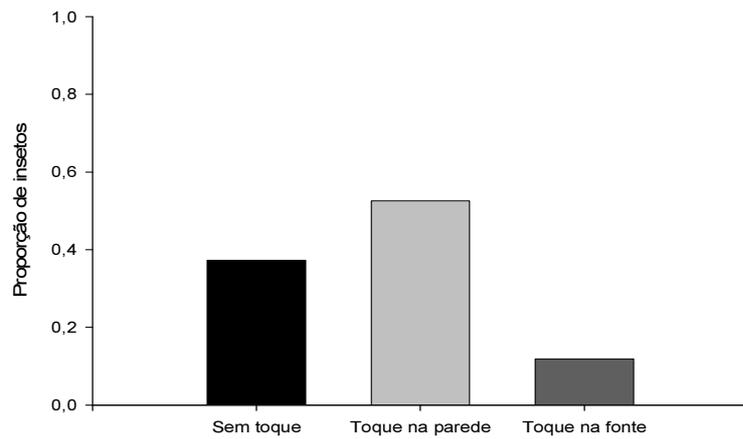


Figura 23: Relevância do contato antenal na expressão do PER em insetos antenectomizados unilateralmente. Condições de *closed-loop*. Fonte térmica a 40°C. N= 59 insetos.

Nos casos em que insetos antenectomizados não tocaram a parede da arena com sua antena intacta, o PER foi realizado preferencialmente a distâncias próximas da fonte. Porém, a expressão do PER nestas condições abrangeu uma faixa de distância relativamente ampla (Figura 24). Desta forma, não houve uma distância claramente preferencial na qual os insetos antenectomizados realizaram PER com maior frequência.

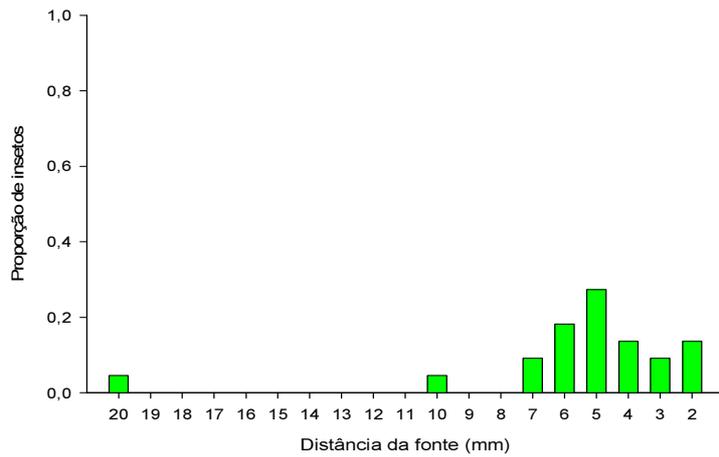


Figura 24: Proporção de insetos antenectomizados unilateralmente que apresentaram PER em função da distância à fonte térmica. Os resultados representados correspondem a insetos que não contataram a superfície da arena com suas antenas antes do PER. Condições de *closed-loop*. Fonte térmica a 40°C. N= 22.

b) *Insetos em condições de open-loop*

Nos ensaios em que insetos antenectomizados unilateralmente foram mantidos em condições de *open-loop*, observou-se que a expressão do PER variou em função da distância à fonte térmica (Figura 25). Neste caso, o PER foi realizado a uma distância da fonte aparentemente maior do que aquela observada nos insetos intactos (Figura 19). Cabe salientar que, em condições de *open loop*, os insetos antenectomizados nunca tocaram a fonte térmica com a antena intacta antes de realizar o PER. Além disto, e de maneira diferente dos insetos com as antenas intactas, todos os insetos antenectomizados testados apresentaram PER na condição de *open loop*.

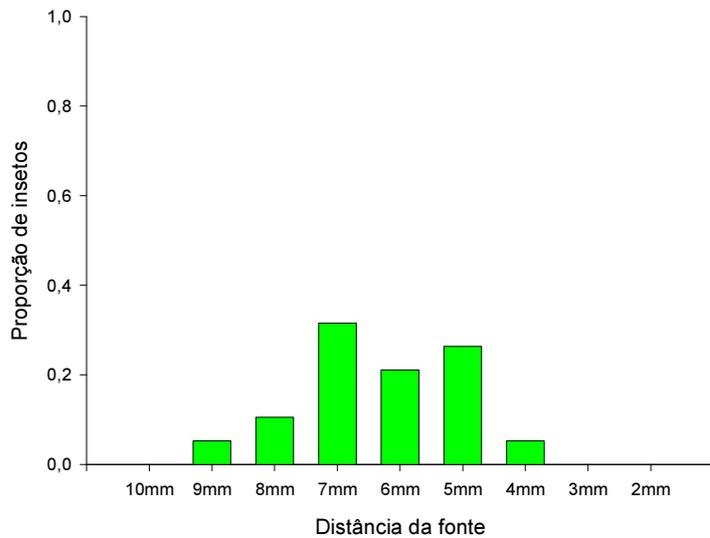


Figura 25: Proporção de insetos antenectomizados unilateralmente que apresentaram PER em função da distância à fonte térmica. Condições de *open-loop*. Fonte a 40°C. N= 19.

c) *Comparação das condições de closed-loop x open-loop*

Posteriormente, comparou-se a distribuição de distâncias em que o PER foi realizado por insetos antenectomizados unilateralmente em condições de *closed* ou *open-loop*. Esta comparação permitiu avaliar se havia diferenças na distância em que os insetos realizavam PER nas duas condições, conforme observado para insetos intactos. Entretanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os perfis de distância comparados (*Qui-quadrado* corrigido pelo método de Yates, n.s).

d) *Comparação entre os dados obtidos com insetos intactos x antenectomizados*

Adicionalmente, comparou-se a expressão de PER em função da distância à fonte em insetos intactos e antenectomizados em condições de *open-loop* e distância fixa. Constatou-se que os insetos antenectomizados mostraram um perfil de PER em função da distância significativamente diferente daquele dos insetos intactos (*Qui-quadrado* corrigido pelo método de Yates, $p < 0,0001$).

e) *Insetos antenectomizados bilateralmente*

Finalmente, testou-se a capacidade de realizar o PER em resposta a estímulos térmicos em insetos antenectomizados bilateralmente. Estes ensaios foram realizados em condições de *open-loop*. Da mesma forma que o observado por Flores (2005), após testar o comportamento de um grupo de 26 insetos, não foi observado PER em resposta à fonte térmica.

5.2.6 Papel do estímulo mecânico na expressão do PER

a) *Apresentação do estímulo térmico e mecânico simultaneamente em insetos intactos*

A primeira série de ensaios teve o objetivo de avaliar se o contato das antenas com um objeto a temperatura ambiente era capaz de disparar ou aumentar a taxa de PER em insetos intactos quando este objeto era apresentado junto com o estímulo térmico. Isto foi avaliado somente em distâncias em que o PER não tinha sido observado, ou tinha sido pouco freqüente. Observou-se que a apresentação do estímulo mecânico, junto ao térmico, não foi capaz de desencadear o PER em insetos intactos a 10 e 8 mm da fonte. No entanto, a taxa de PER elevou-se de 4% para 64%, quando comparados os resultados obtidos com estimulação térmica e os de co-apresentação dos estímulos a 6 mm da fonte (*Qui-quadrado* corrigido pelo método de Yates $p < 0,0002$).

b) *Apresentação simultânea do estímulo térmico e mecânico em insetos antenectomizados*

Em insetos antenectomizados unilateralmente e em condições de *open loop*, observou-se que a apresentação do estímulo térmico e o contato simultâneo das antenas com um objeto promoveu o PER em distâncias nas quais o calor não o desencadeia (e.g., 10 mm, insetos antenectomizados, *open loop*, Figura 25). Além disto, a freqüência de PER a distâncias em que este é infreqüente frente ao calor (e.g., 8 mm) foi aumentada pela co-apresentação do estímulo mecânico. Dos insetos antenectomizados testados a 10 mm, 57% realizaram PER frente a co-apresentação dos estímulos térmico e mecânico, sendo que, sem o estímulo mecânico, não houve PER nestas condições. Após a co-apresentação dos estímulos térmico e mecânico, 79% dos insetos realizaram PER a 8 mm, sendo que, frente ao estímulo térmico

isolado, somente 11% dos insetos estenderam o rostro nessa distância. Desta maneira, foi evidenciado um efeito causado pela co-apresentação do estímulo mecânico, que foi estatisticamente significativo (*Qui-quadrado* corrigido pelo método de *Yates*, $p < 0,0003$).

c) *Apresentação do estímulo mecânico a insetos intactos e antenectomizados*

Finalmente, foi realizado um experimento para verificar se o estímulo mecânico isolado era capaz de disparar o PER em insetos intactos e antenectomizados. Verificou-se que 7% dos insetos intactos responderam à estimulação mecânica realizando PER. Ainda, observou-se que 41% dos insetos antenectomizados unilateralmente realizaram PER frente a este tipo de estímulo.

5.3 Mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em *R. prolixus*

5.3.1 Experimento 1

a) *Insetos antenectomizados unilateralmente*

Nestes ensaios foi testada a relevância da integração bilateral da informação detectada por cada antena no direcionamento das primeiras picadas, ou seja, a capacidade de contatar a fonte térmica linear nos insetos antenectomizados unilateralmente. Observou-se que os insetos antenectomizados unilateralmente endereçam as primeiras picadas preferencialmente para o lado correspondente à antena intacta (Figura 26).

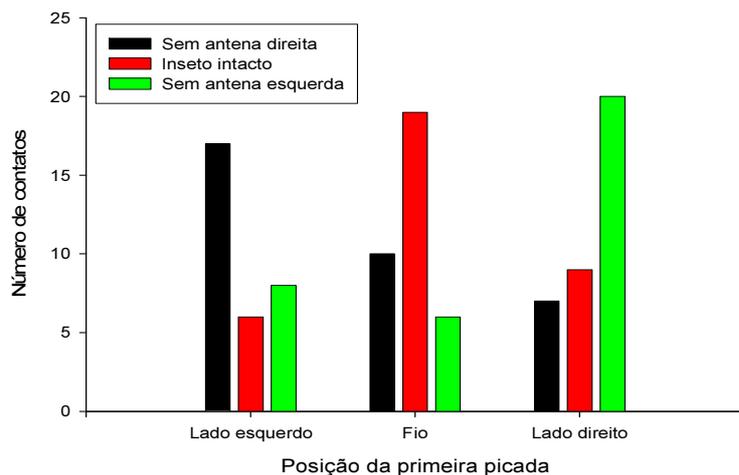


Figura 26: Distribuição das primeiras picadas, i.e, o primeiro contato do rostro com a fonte térmica, realizados pelos insetos intactos (barras vermelhas, n=34) e antenectomizados unilateralmente (esquerdo: verde, n=34; direito: preto, n=34).

b) Insetos antenectomizados bilateralmente

Nestes ensaios foi testado se após o corte das duas antenas os insetos são capazes de contactar a fonte térmica linear com o seu rostro. Os insetos sem antenas não mostraram o reflexo de extensão do rostro em nenhum dos ensaios realizados. Porém, observou-se durante a realização destes ensaios que os insetos apresentavam uma tendência a permanecer sobre a fonte térmica.

5.3.2 Experimento 2

a) Contatos totais do rostro

Durante a trajetória dos insetos, observou-se que os mesmos sempre estenderam o rostro a uma distância próxima da fonte térmica. Logo após a extensão da probóscide, os triatomíneos contactavam a fonte com o extremo deste órgão em repetidas ocasiões. O número e a duração das visitas dos insetos à fonte térmica foram muito variáveis.

Foram observados os seguintes padrões de contato do rostro com a fonte térmica: 1) contatos alternados em diversos pontos da fonte térmica com uma taxa

de repetição alta; 2) contatos de longa duração do rostro com a fonte térmica; 3) contatos em forma de varredura, onde o rostro contactava a fonte e era deslizado pela superfície da mesma sem interromper o contato físico. Geralmente, cada inseto apresentava mais de um destes padrões de comportamento ao longo dos seus contatos com a fonte térmica. O padrão tipo 1 foi o mais freqüente, enquanto o tipo 3 foi o menos frequente.

Os diferentes tipos de contato foram agrupados em uma única categoria denominada *contatos totais do rostro*. Posteriormente, foi comparado o número total de contatos do rostro em insetos com antenas intactas e insetos antenectomizados unilateralmente. Observou-se que os insetos intactos apresentaram um maior número de contatos totais do que os antenectomizados unilateralmente (Figura 27, *Mann Whitney* $p < 0,04$).



Figura 27: Efeito da antenectomia unilateral sobre o número total de contatos do rostro realizados por *R. prolixus*. Fonte térmica plana a 33 °C e fonte térmica linear a 36 °C. Insetos antenectomizados (n = 15). Insetos intactos (n = 14).

b) Contatos prolongados do rostro

Durante os contatos prolongados do rostro, as antenas dos insetos normalmente permaneceram imóveis, retomando a movimentação momentos antes da retirada do rostro da superfície da membrana de látex.

O número de contatos prolongados do rostro não foi afetado significativamente pela retirada de uma das antenas dos insetos, já que os insetos antenectomizados

unilateralmente realizaram um número similar de contatos prolongados ao dos insetos intactos (Figura 28, *Mann Whitney* $p < n.s$).

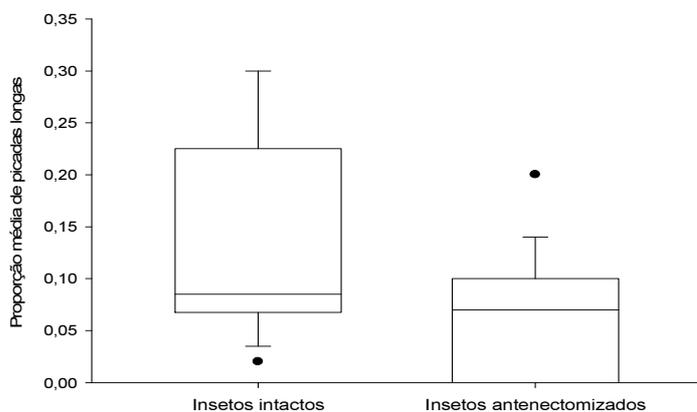


Figura 28: Efeito da antenectomia unilateral sobre a frequência dos contatos prolongados do rostro. Fonte térmica plana a 33 °C e fonte térmica linear a 36 °C. Insetos antenectomizados $n = 15$. Insetos intactos $n = 14$.

c) Número de contatos prolongados do rostro em função da distância à fonte térmica linear

Os triatomíneos intactos concentraram as picadas prolongadas na metade da fonte térmica plana mais próxima da fonte térmica linear (Figura 29). Já os insetos antenectomizados concentraram suas picadas sobre as três primeiras faixas de distância à fonte térmica linear (Figura 29). Desta forma, houve uma diferença significativa entre os grupos, já que os insetos antenectomizados unilateralmente concentraram as suas picadas prolongadas mais próximas da fonte térmica linear (*Mann Whitney*, $p < 0,004$).

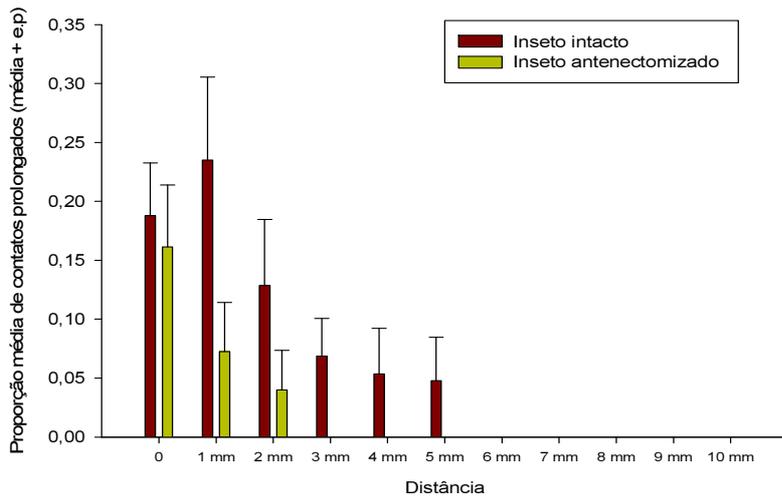


Figura 29: Proporção média de contatos prolongados do rostro dos insetos em relação à distância da fonte térmica linear. Fonte térmica plana a 33 °C e fonte térmica linear a 36 °C. Insetos antenectomizados n = 15. Insetos intactos n = 14.

d) Duração média dos contatos prolongados do rostro

Em geral, a duração dos contatos prolongados variou de 1,5 a 51 s. Entretanto, a duração média dos contatos foi significativamente maior nos insetos intactos do que nos insetos antenectomizados (Figura 30, *Mann Whitney* $p < 0,001$).

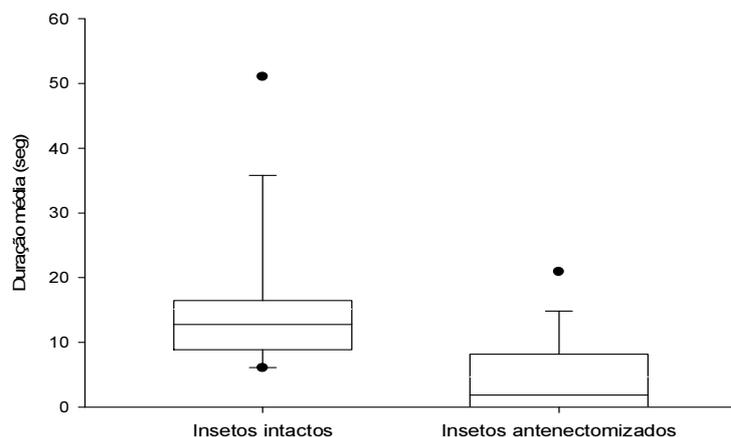


Figura 30: Efeito da antenectomia unilateral sobre a duração média dos contatos prolongados do rostro. Fonte térmica plana a 33 °C e fonte térmica linear a 36 °C. Insetos antenectomizados n = 15. Insetos intactos n = 14.

5.4 Caracterização de estruturas sensoriais do rostro e antena de *R. prolixus* e suas projeções dentro do SNC

5.4.1 Descrição dos receptores presentes no terceiro segmento rostral de *R. prolixus*

Através da diafanização do rostro dos insetos foi possível evidenciar a presença de uma grande quantidade de pêlos longos na superfície deste apêndice. Estas estruturas, devido ao fato de terem uma base flexível, teriam aparente função mecano-receptora (Figura 31). Além destas sensilas, foi evidenciada a presença de um conjunto de pequenos pêlos no extremo do terceiro segmento rostral. Entretanto, através desta técnica não foi possível observar detalhes dos mesmos. Sendo assim, foram montadas preparações de microscopia eletrônica de varredura foram montadas para melhorar a descrição destas estruturas.

Através da utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar em maior detalhe as sensilas presentes no terceiro segmento rostral dos insetos. A maioria dos pêlos presentes nesta região possui uma morfologia que sugere se tratar de sensilas do tipo caética, com função

mecanosensorial. Estes pêlos possuem base articulada, são finos, grandes e projetados na superfície, atingindo uma posição mais alta do que os outros pêlos sensoriais (Figura 32A). Os pêlos presentes no extremo do terceiro segmento do rostro apresentam características morfológicas que sugerem uma provável função químio-receptora (Figura 32B). Isto porque tais pêlos possuem base não articulada, são mais grossos, mais curtos e não se projetam muito na superfície do tegumento (ficam por baixo da camada de mecanorreceptores).

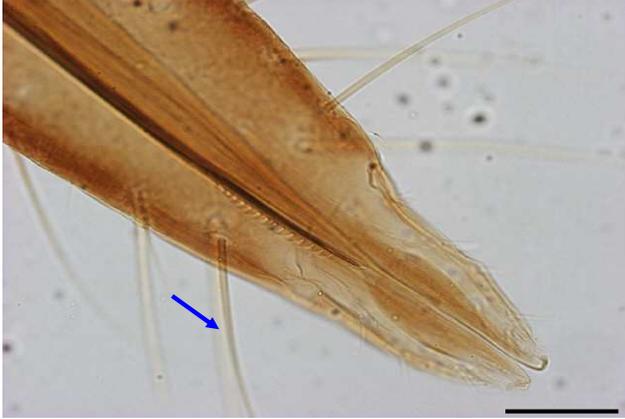
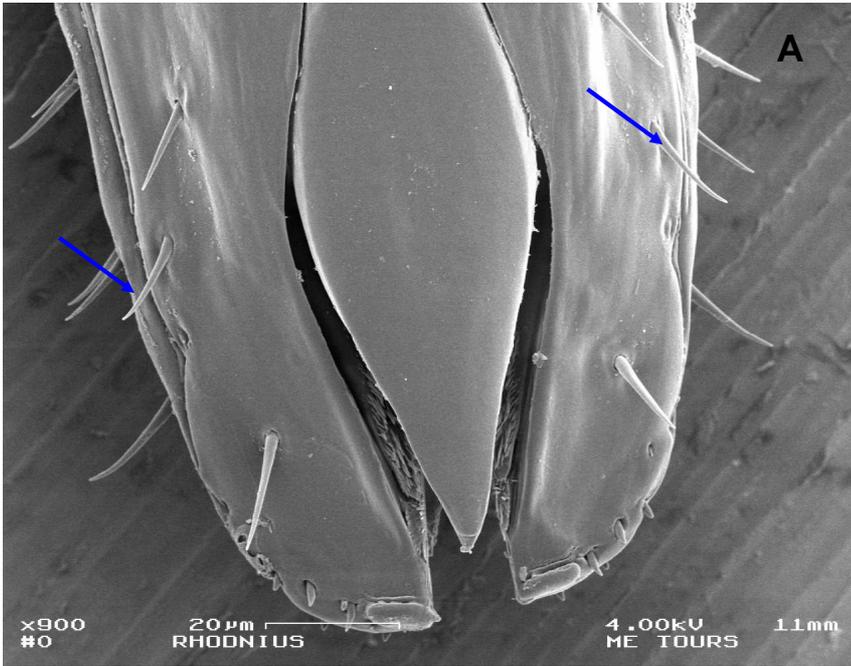


Figura 31: Vista por diafanização do último segmento rostral de *R. prolixus*. A seta destaca um pêlo com aparente função mecano-receptora, escala da barra= 50 μ m.



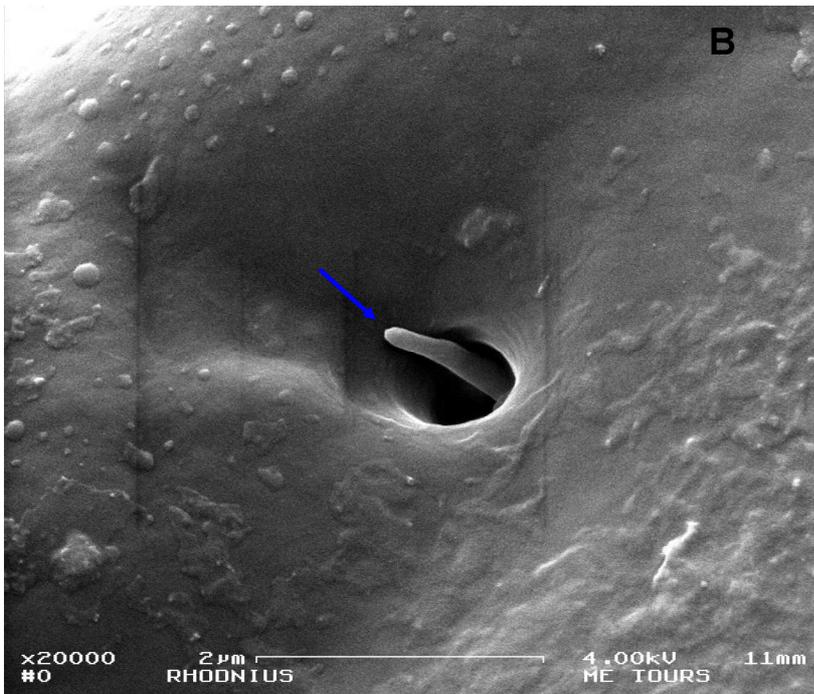


Figura 32: Vista do último segmento rostral de *R. prolixus*. Em A, a seta destaca um pêlo com possível função mecano-receptora. Em B, a seta destaca um pêlo com possível função quimio-receptora.

5.4.2 Descrição das estruturas internas do rostro de *R. prolixus*

Foi verificada a posição de diversas estruturas internas do rostro dos insetos (Figura 33). No arranjo geral, foi evidenciado que os nervos, em número de dois, localizam-se numa posição lateral e superior às traquéias. A contagem realizada utilizando um aumento de 400 vezes no microscópio óptico permitiu constatar que cada um dos nervos rostrais apresenta um número aproximado de 130 axônios. O rostro possui um sulco longitudinal na sua face ventral. Em uma seção transversal, esse sulco é mais amplo no centro e, dentro dele, podem se observar os estiletes mandibulares e maxilares. O par de estiletes mandibulares localiza-se numa região mais externa e envolve o par de estiletes maxilares que, por sua vez, define o canal alimentar. Ambas as estruturas, estiletes maxilares e mandibulares, apresentam

revestimento cuticular. Foi observado um grande volume de tecido muscular dentro do rostro.

Comparadas as seções transversais dos três segmentos do rostro, apenas uma sutil variação no posicionamento das estruturas foi evidenciada. Como exceção, foi observado que os nervos rostrais somente são visíveis depois do primeiro terço do segmento rostral distal. Além disto, a cavidade que aloja os estiletes torna-se mais fina à medida que o rostro vai também se afinando, assim como o volume de tecidos diminui.

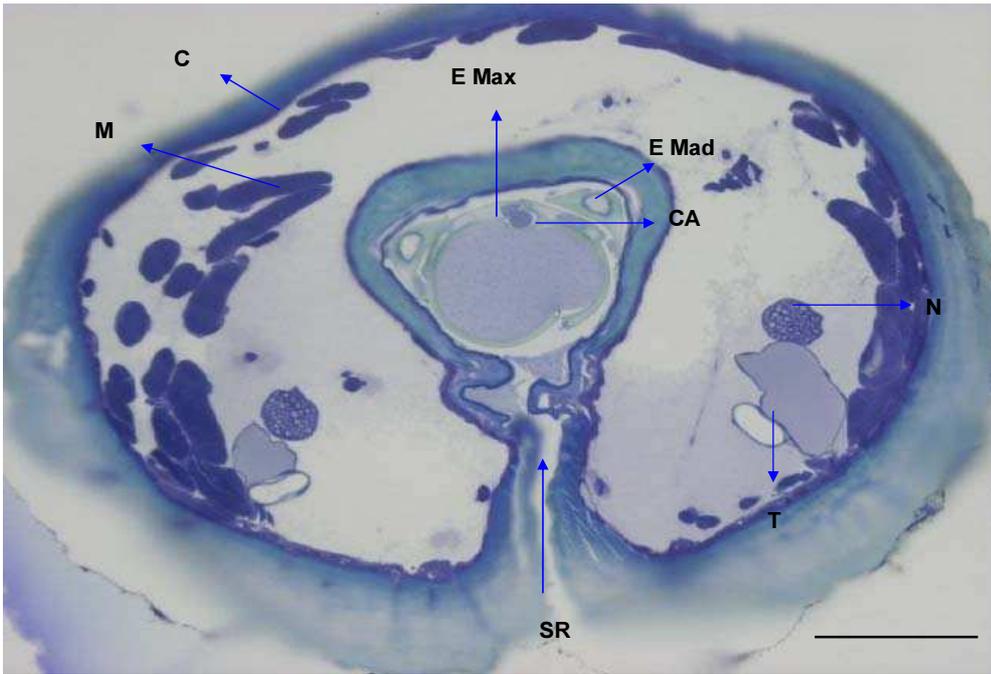


Figura 33: Corte transversal do segmento rostral proximal de *R. prolixus* corado por azul de toluidina. C = cutícula, CA= canal alimentar + canal salivar, E MAD= estilete mandibular, E MAX= estilete maxilar, M= músculo, N= nervo, SR= sulco rostral T= traqueíola. Escala da barra= 100 μ m.

5.4.3 Projeções de células rostrais no SNC

A comparação das projeções de células provenientes do rostro de ninfas de 5º estágio com aquelas dos adultos de *R. prolixus* não mostrou diferenças relevantes. Além disso, também não foram visualizadas diferenças na localização das projeções provenientes de cada um dos três segmentos do rostro. Aparentemente, as fibras juntam-se aos nervos em cada segmento, de forma a seguirem o mesmo trajeto e apresentam semelhante disposição quando se ramificam.

As projeções dos neurônios do rostro chegam ao SNC pelo par de nervos labiais e projetam-se no gânglio subesofágico, onde arborizam provavelmente no neurópilo mandibular-maxilar (Figura 34, 35) localizando-se em posição ventral no gânglio (Figura 34,35,36). As projeções, muito numerosas, formam um grosso arranjo em forma de alfa no gânglio subesofágico (Figura 34, 38). Isto porque, neste gânglio, bem como no protorácico, algumas fibras dirigem-se para a sua região central, onde suas projeções sobrepõem-se àquelas oriundas do fascículo contralateral (Figura 36, 37). Deste ponto, alguns axônios descem ao gânglio posterior, estrutura na qual se ramificam no neurópilo mesotorácico (Figura 35), sempre de forma ventral. Não foram observadas projeções de neurônios rostrais nos centros superiores do SNC.

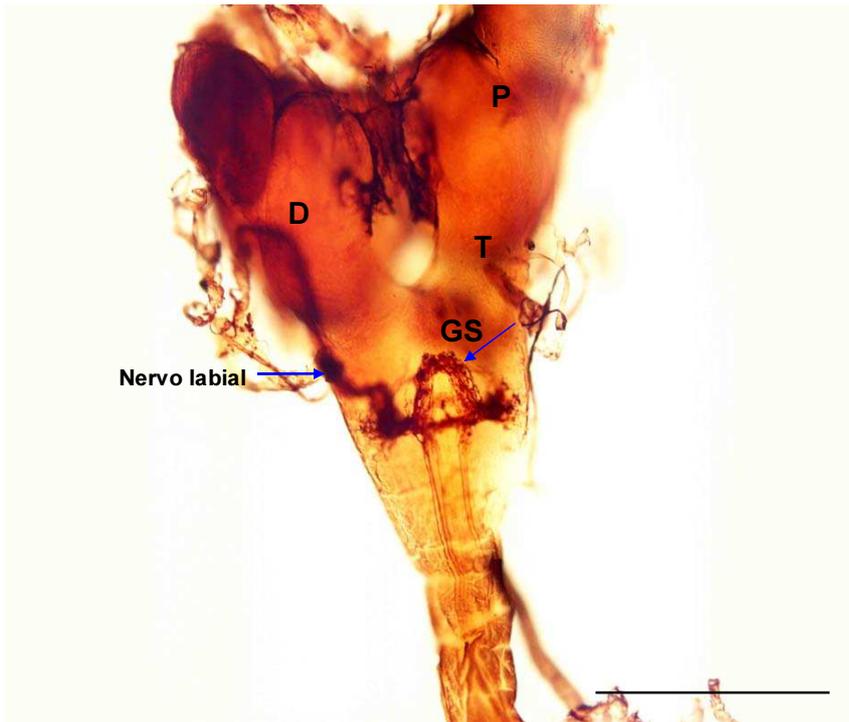


Figura 34: Vista ventral do cérebro e gânglio subesofágico de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. Um nervo labial esta indicado por uma seta. A outra seta indica prováveis fibras de neurônios sensoriais provenientes do rostro e corados por cloreto de cobalto. P= protocérebro, D= deutocérebro, T= tritocérebro, GS= Gânglio subesofágico. Escala da barra = 500 μ m.

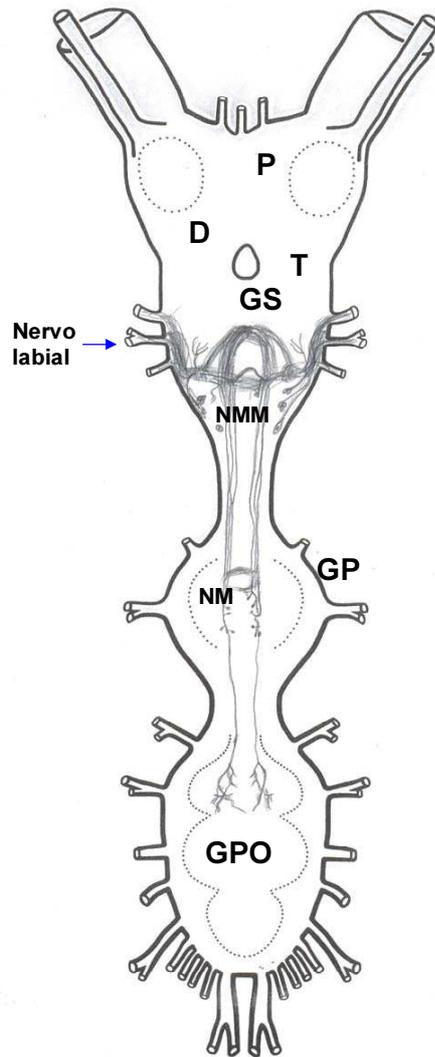


Figura 35: Desenho esquemático em vista ventral da reconstrução da trajetória dos neurônios do cérebro e gânglio subesofágico de *R. prolixus*. P= protocérebro, D= deutocérebro, T= tritocérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= Gânglio protorácico, GPO= Gânglio posterior, NMM= neurópilo maxilar-mandibular, NM= neurópilo mesotorácico.

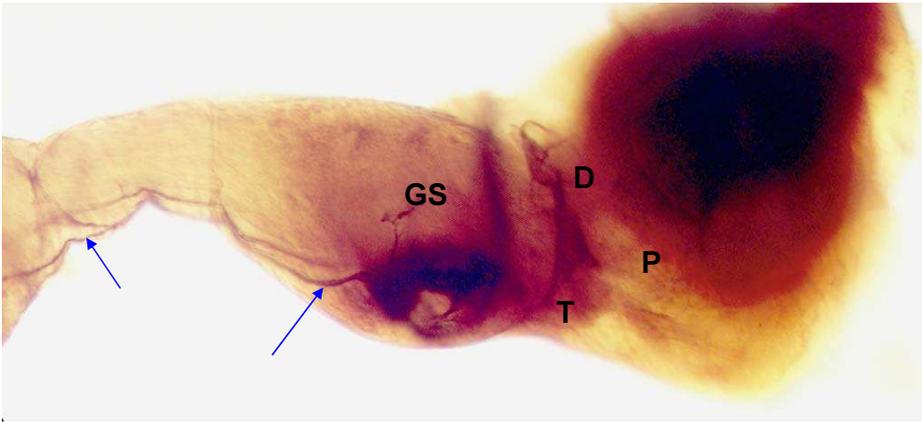


Figura 36: Vista lateral do glânglio subesofágico e do glânglio protorácico de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. As setas indicam fibras oriundas de receptores do rostro em posição ventral. P= protocérebro, D= deutocérebro, T= tritocérebro, GS= Glânglio subesofágico.



Figura 37: Vista ventral de um detalhe do glânglio protorácico de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. A seta indica uma projeção de receptores do rostro. Escala da barra = 50 μ m.



Figura 38: Vista ventral do gânglio subesofágico de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. A seta mostra o conjunto das projeções de receptores do rostro em forma de “alfa”, escala da barra= 100 μ m.

Foram utilizadas as técnicas de difusão de rodamina e neurobiotina para complementar a visualização das projeções provenientes do rostro dos insetos. Ambas as técnicas (Figura 39) mostraram basicamente as mesmas projeções e o mesmo arranjo observado nas preparações de cloreto de cobalto. No entanto, através da difusão de rodamina, foi visualizada com grande nitidez a presença de vários corpos celulares (Figura 40), provavelmente de células motoras que controlariam os músculos do rostro dos insetos.

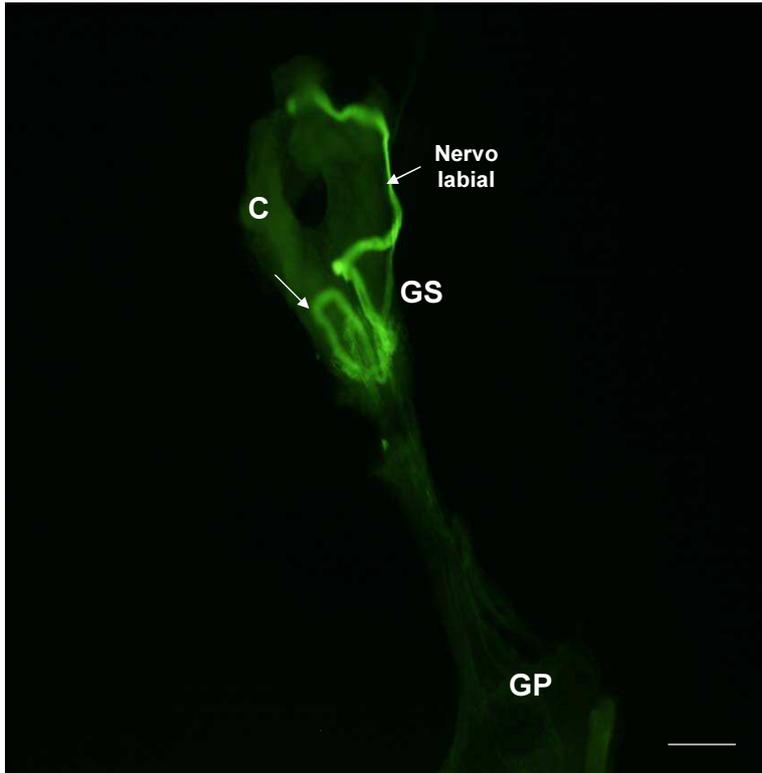


Figura 39: Vista dorsal do gânglio subesofágico e do gânglio protorácico de *R. prolixus*. A seta mostra fibras do rostro marcadas com neurobiotina. Escala da barra = 100 μ m. C = cérebro, GS= gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico.

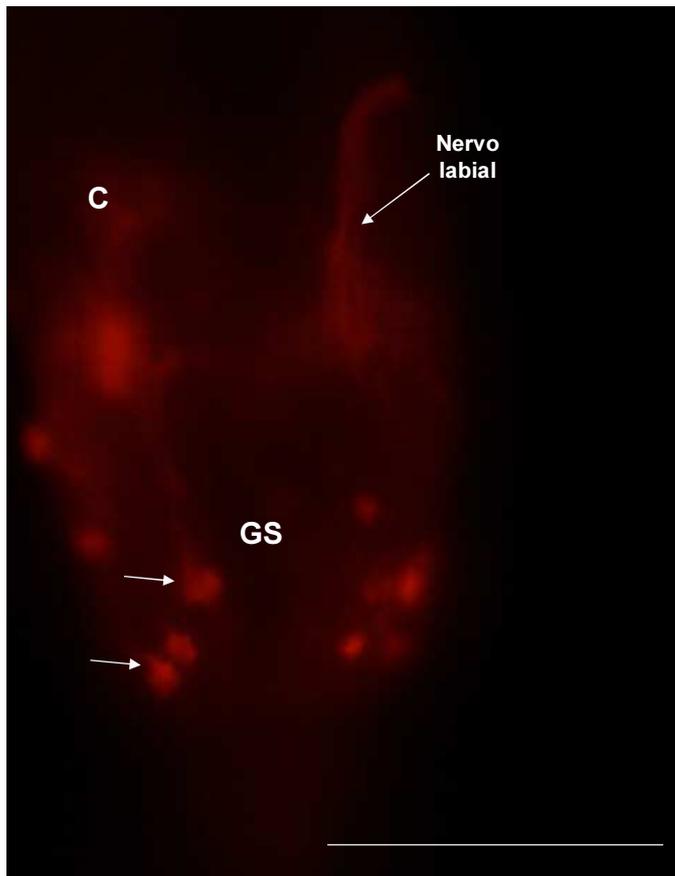


Figura 40: Vista dorsal do gânglio subesofágico de *R. prolixus*. As setas indicam corpos celulares motores marcados com rodamina, C = cérebro, GS= gânglio subesofágico, escala da barra = 100 μ m

5.4.4 Projeções de receptores antenais no SNC

As projeções dos neurônios das antenas de ninfas de 5° estágio foram similares as mostradas para *R. prolixus* adultos (Barrozo *et al.* 2008). Estas

projeções (Figura 41) iniciam-se nos glomérulos do lóbulo antenal, e ainda muitas passam para o protocérebro, gânglio sub-esofágico, gânglio protorácico e último terço do gânglio posterior (Figura 42). As fibras arborizam a nível do gânglio subesofágico, protorácico e posterior.

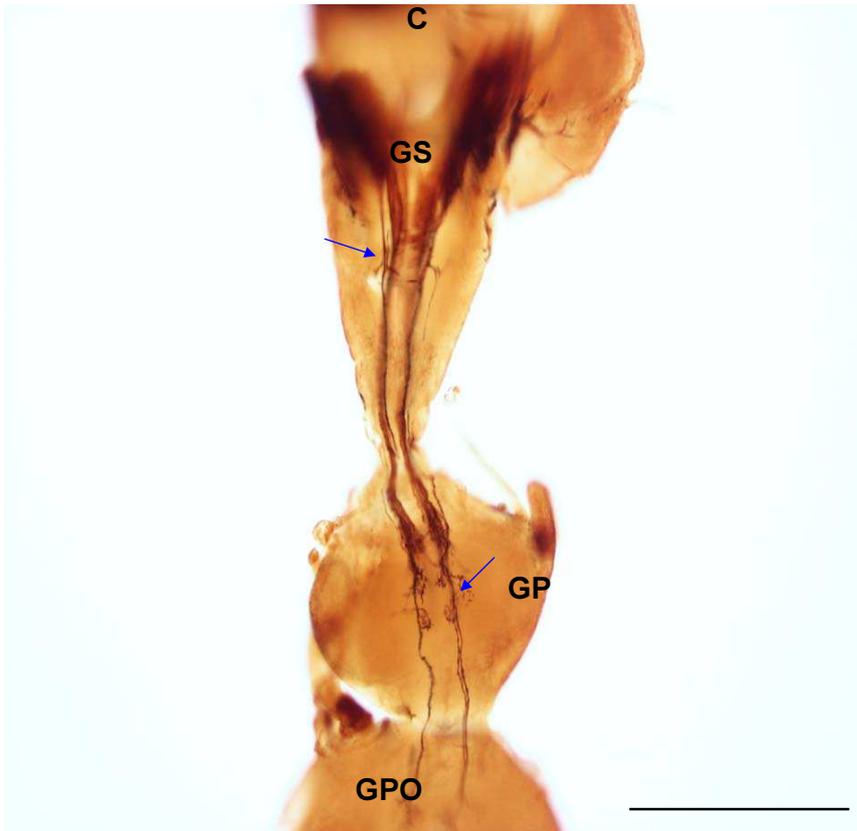


Figura 41: Vista ventral do sistema nervoso de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. As setas mostram projeções dos neurônios das antenas, escala da barra = 100 μ m. C = cérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico, GPO= gânglio posterior.

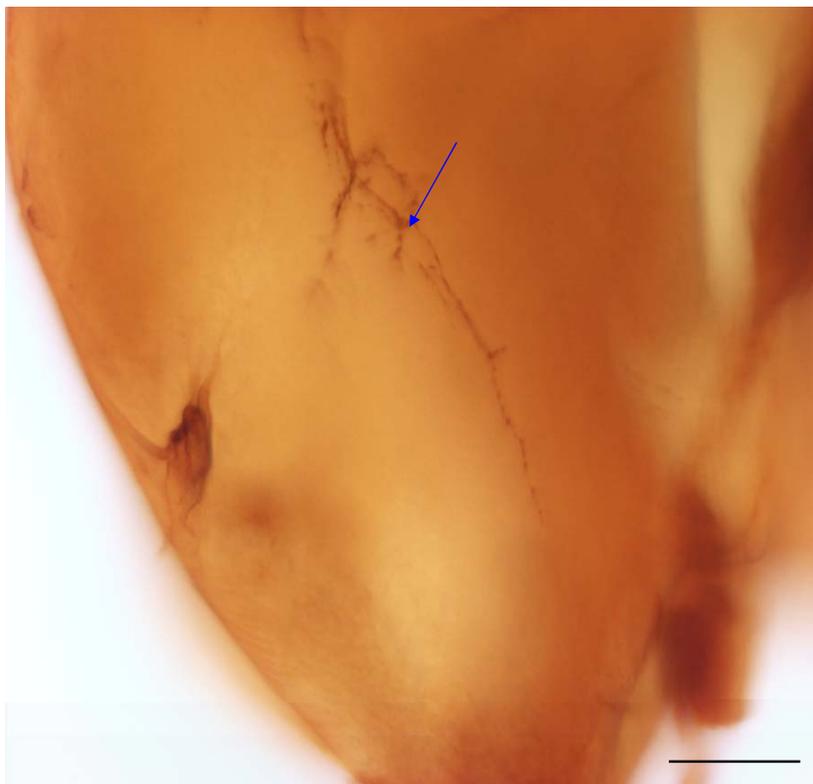


Figura 42: Vista ventral do gânglio posterior de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. A seta indica o extremo final de uma arborização de um neurônio da antena, escala da barra = 100 μm .

A difusão de rodamina pelos nervos antenais dos insetos confirmou o arranjo das fibras visualizado nas preparações feitas com o cloreto de cobalto (Figura 43 e 44).

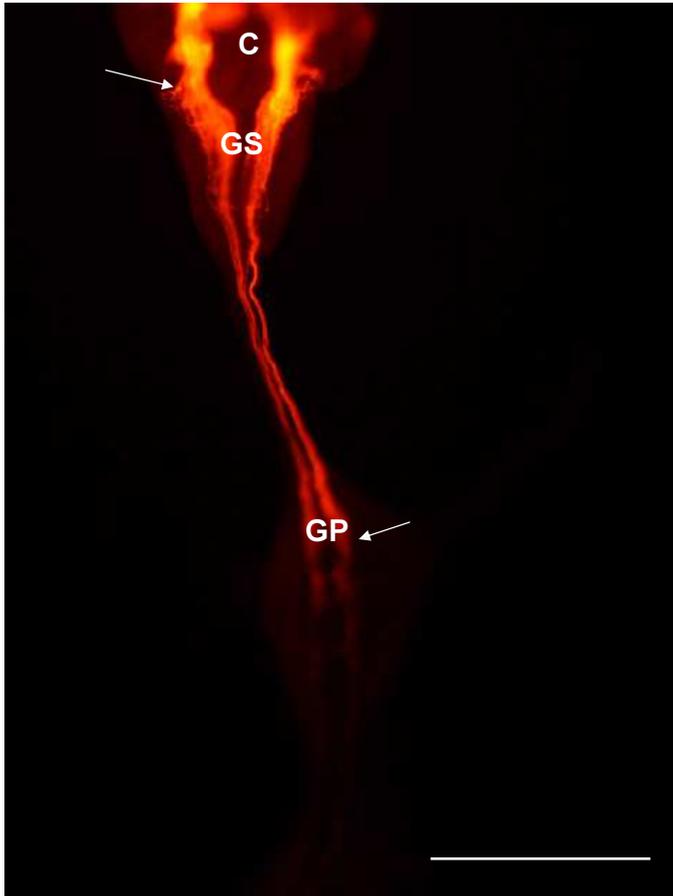


Figura 43: Vista dorsal do sistema nervoso de *R. prolixus*. As setas destacam-se as projeções de neurônios das duas antenas marcadas com rodamina, C= cérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico, escala da barra= 500 μ m.

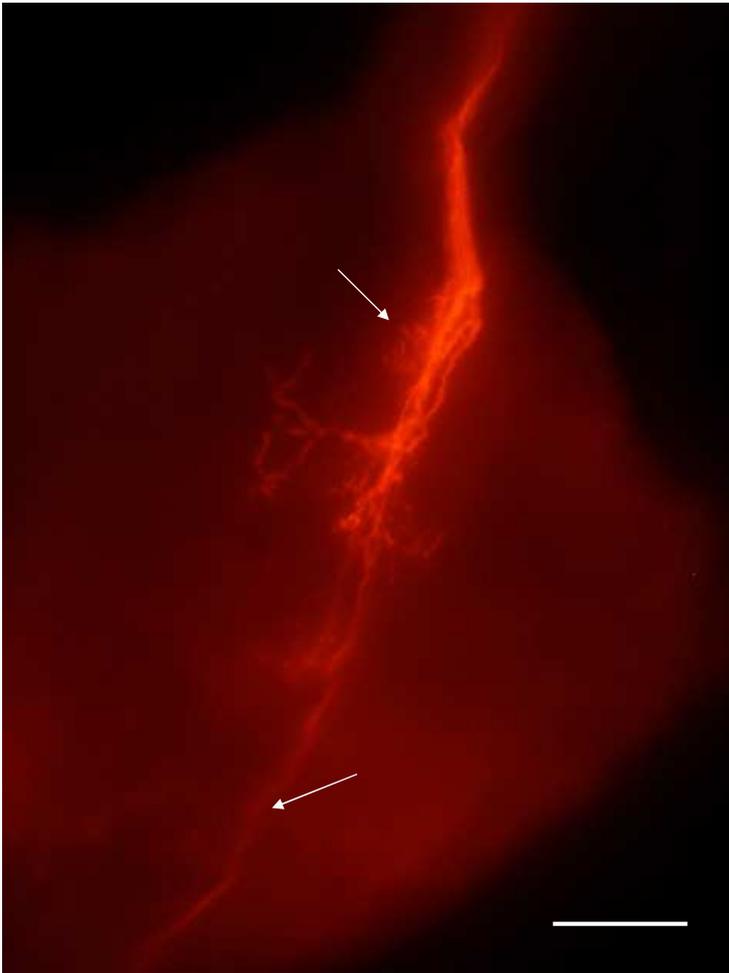


Figura 44: Vista dorsal do gânglio protorácico de *R. prolixus*. As setas indicam projeções de fibras antenais marcadas com rodamina, escala da barra= 100 μ m.

5.4.5 Convergência das projeções de neurônios da antena e rostro de *R. prolixus*

A difusão de cloreto de cobalto realizada simultaneamente pelas antenas e rostro dos insetos evidenciou que, possivelmente, na região do glânglio subesofágico haveria uma área de integração das informações transmitidas pelas fibras provenientes das antenas e do rostro (Figura 45). Entretanto, não foi possível

confirmar a existência de tal área de conexão sem realizar cortes das preparações. Desta forma, os mesmos foram realizados a fim de poder avaliar a existência de tal área de conexão. Apesar do uso desta técnica, não foi possível determinar a existência de uma área de integração entre fibras das antenas e do rostró (Figura 45).

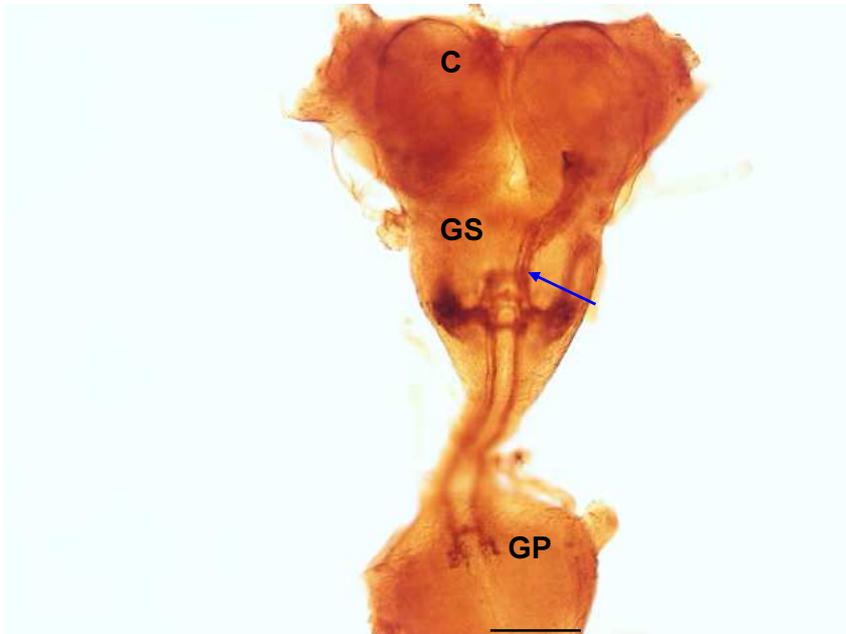


Figura 45: Vista dorsal do sistema nervoso de *R. prolixus* corado por cloreto de cobalto. A seta mostra uma região do gânglio subesofágico que aparentemente apresenta conexões de fibras das antenas e do rostró. C = cérebro, GS= Gânglio subesofágico, GP= gânglio protorácico, escala da barra= 500 μ m.

6 Discussão

6.1 Atividade de *R. prolixus* associada ao abrigo

Os resultados apresentados são os primeiros a descreverem o uso de abrigos por *R. prolixus*, caracterizando tanto a atividade basal de saída/entrada, quanto a locomoção espontânea dos insetos neste contexto. Adicionalmente, o presente trabalho apresenta evidências de que há uma modulação significativa destes dois parâmetros pela presença de odores do hospedeiro. Os dados evidenciam que o jejum dos insetos modula fortemente a sua atividade no contexto do uso de abrigos. Finalmente, os resultados sugerem a existência de um padrão de modulação temporal destas atividades em insetos mantidos em 60 dias de jejum na presença de sinais do hospedeiro.

6.1.1 Atividade espontânea em abrigos

A atividade de saída dos abrigos foi praticamente nula nos ensaios em que os insetos foram estudados na ausência de odores de camundongo. Portanto, não foi possível observar variações significativas no padrão temporal de atividade de saída dos insetos nestas condições. Porém, é possível observar certa tendência de insetos mantidos em extremo jejum a deixarem os abrigos nas primeiras horas da escotofase e de retornar aos mesmos no final desta fase. Além disto, o número de saídas de insetos dos abrigos na ausência de pistas da presença do hospedeiro não variou significativamente em função do nível de jejum. Isto é diferente do descrito previamente para ninfas de *T. infestans* que mostram um aumento na sua tendência a saírem dos abrigos quando testadas com jejum prolongado (Lorenzo & Lazzari, 1998). Apesar de não ter sido observado um efeito significativo do jejum sobre a atividade locomotora espontânea dos insetos, foi possível observar que tal atividade é aparentemente maior em insetos com 30 dias de jejum (Figura 9).

6.1.2 Efeito dos odores do hospedeiro

Os dados apresentados revelam que a presença de pistas do hospedeiro vertebrado influenciou a dinâmica de saída de abrigo. Além disso, a atividade locomotora dos insetos foi sensivelmente aumentada na presença de odores de camundongo. Desta maneira, é possível afirmar que os odores de hospedeiro possuiriam a capacidade de ativar os insetos que estão em *akinesis* dentro de abrigos. Esta afirmação é particularmente válida para insetos com jejum igual ou

superior a 30 dias. Surpreendentemente, os insetos com 21 dias de jejum não responderam significativamente aos odores de hospedeiro, tendendo a permanecer dentro dos abrigos apesar da presença destes sinais. Sugere-se que a resposta de ativação mediada por odores de hospedeiros teria um limiar motivacional controlado pelo estado nutricional e que somente seria expressa essa ativação em insetos com jejum entre 21 e 30 dias. Os dois parâmetros avaliados confirmam tal afirmação, já que foram mais os insetos com jejuns avançados que deixaram os abrigos. Bem como apresentaram maior atividade locomotora, nestas condições fisiológicas na presença de odores do hospedeiro. Nosso trabalho não teve o intuito de analisar a ritmicidade destes comportamentos, nem o seu controle por mecanismos de relógio endógeno. Apesar disso, os dados obtidos sugerem que há uma variação temporal na sua expressão para insetos mantidos em jejum de 60 dias e que, durante as primeiras horas da fase escura, as ninfas de *R. prolixus* parecem mostrar uma maior motivação para procurar seus hospedeiros. De maneira geral, o balanço de saídas menos entradas tendeu a ser positivo na primeira metade da escotofase. Por outro lado, na última hora da escotofase predominaram balanços negativos, coincidentemente com o descrito por Lorenzo & Lazzari (1998) para ninfas de *T. infestans*. Sugere-se que nessa janela temporal *R. prolixus* expresse uma maior atividade relacionada com a procura de abrigos. A atividade locomotora na presença de odores do hospedeiro foi intensa e significativamente maior do que na ausência dos hospedeiros e não foi possível observar mudanças importantes nessa atividade ao longo das horas da fase escura estudadas. Cabe salientar que é possível que tal atividade na presença do hospedeiro caia na segunda metade da fase escura, mas estes dados não foram registrados aqui e, portanto, é necessário caracterizar melhor a variação temporal destes parâmetros.

6.1.3 A estratégia de procura do hospedeiro de *R. prolixus*

A bibliografia indica que ninfas de *T. infestans* saem dos abrigos espontaneamente para se alimentar durante a noite e que esta atividade é aumentada no início da mesma (Lorenzo & Lazzari, 1998). Ainda segundo esses autores, a proporção de insetos que deixam o abrigo em cada noite é muito baixa. De forma mais marcada ainda, os dados apresentados aqui demonstram que ninfas de *R. prolixus* quase não deixaram os seus abrigos espontaneamente. Contudo, observou-se que na presença de pistas do hospedeiro um maior número de insetos

deixou o abrigo, sobretudo quando o nível de jejum destes era avançado. Logo, sugere-se que os insetos desta espécie somente se ativam e deixam o abrigo fundamentalmente após a percepção de odores do hospedeiro e que esta ativação é dependente do nível do jejum no qual se encontram. Reisenman *et al* (1998) sugeriram que a fototaxia negativa em triatomíneos tem uma função adaptativa relevante. Este comportamento seria importante para que os insetos evitem locais iluminados e, conseqüentemente, diminua a probabilidade de serem predados. Esses autores propõem que o comportamento apresentado por *T. infestans* pode ser descrito por pelo menos dois componentes motivacionais: um exploratório, que promove a saída de abrigos e um segundo inibitório, promovido pela resposta fototática negativa sob controle endógeno. Este último componente, inibitório, é particularmente sensível à luz durante a escotofase, quando acontecem os picos de atividade locomotora de retorno ao abrigo. Sugere-se que *R. prolixus* represente um modelo semelhante, no qual o componente exploratório apresente um menor peso na relação hierárquica entre ambas as forças geradoras do comportamento. Insetos desta espécie - e fundamentalmente em jejum pouco avançado - tenderiam a permanecer dentro dos abrigos, não saindo dos mesmos na ausência de pistas do hospedeiro. Esta estratégia pode ser mais relevante para esta espécie, uma vez que *R. prolixus* é muito resistente ao jejum e pode esperar pelo hospedeiro por longos períodos. Desta maneira, hipotetiza-se que somente durante a escotofase, na presença de pistas do hospedeiro tais como odores, e quando os insetos se encontram em jejum avançado, é que *R. prolixus* deixa seus abrigos na procura de alimento.

Cabe salientar que quando os insetos permaneciam fora do abrigo normalmente caminhavam pela arena experimental, mas às vezes interrompiam esta atividade realizando pausas. Estas paradas eram mais comuns na ausência de pistas do hospedeiro, já que as pistas do hospedeiro aumentaram drasticamente a locomoção dos insetos em jejum avançado. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Nuñez (1982) que estudou a atividade de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* em actômetros. O autor apresentou aos insetos estímulos associados com a presença do hospedeiro de duas formas: na primeira, foi colocada uma gaiola com *hamsters* ao lado do actômetro e foi avaliada a atividade locomotora dos insetos em comparação com a basal observada na ausência de hospedeiros; já na segunda, uma corrente de ar passava por uma caixa com *hamsters* e posteriormente era direcionada aos

insetos nos actômetros. Desta forma, a atividade locomotora dos insetos confrontados a corrente de ar associada com odores de *hamster* era avaliada e comparada com a observada na presença da corrente de ar limpa. Em ambos os casos, os odores de *hamster*, com ou sem corrente de ar, foram capazes de induzir um aumento significativo da atividade locomotora dos insetos. Coincidentemente, nossas observações indicam que os odores de hospedeiro são o estímulo desencadeador da atividade das ninfas de *R. prolixus*, sem o qual não é possível observar uma atividade significativa nas mesmas. A inibição dessa atividade seria promovida forte influência das condições predominantes dentro dos abrigos.

Sabe-se que muitas das atividades dos triatomíneos apresentam uma organização circadiana sob controle endógeno (Ampleford & Steel, 1982; Constantinou, 1984; Lazzari, 1991, 1992; Minoli & Lazzari, 2003; Reisenman *et al*, 1998, 2002; Barrozo *et al*, 2004; Bodin *et al*, 2008). Vários estudos descrevem ritmos diários de sensibilidade sensorial em insetos e demonstram modulação principalmente nos sistemas visuais e olfativos (Reisenman *et al*, 1998, 2002; Krishnan *et al*, 1999; Page & Koelling, 2003). Trabalhos prévios mostram que diferentes sinais olfativos são capazes de gerar respostas comportamentais em triatomíneos, em diferentes momentos do dia (Lorenzo & Lazzari, 1998; Barrozo *et al*, 2004; Bodin *et al*, 2008). Wiesinger (1956) sugere que a atividade periódica de *T. infestans* é influenciada pelo jejum prolongado. Wiesinger (1956) propõe 3 períodos de atividade em relação à alimentação: no primeiro, há uma atividade associada com defecação; já no segundo, é um período de inatividade, e, por sua vez, o terceiro, um período de atividade presumivelmente associado com a busca de hospedeiros para a próxima alimentação. Neste último caso, a atividade aumenta de maneira evidente com o avanço do jejum. De fato, nossos resultados mostram que insetos com jejum mais avançado apresentaram um aumento drástico na atividade locomotora e na atividade de saída do abrigo frente às pistas provenientes do hospedeiro. Sabe-se que triatomíneos - e particularmente insetos do gênero *Rhodnius* - são tolerantes ao jejum, ou seja, estes insetos podem passar longos períodos sem alimentação. Desta forma, conforme já discutido acima, sugere-se que permanecer no abrigo seja vantajoso para *R. prolixus*. Uma vez fora do abrigo, os insetos procuram o hospedeiro insistentemente e durante boa parte da noite, conforme mostram nossos resultados.

No presente estudo, a maioria das ninfas que saíram do abrigo não retornaram,

sobretudo nas séries em que sinais do hospedeiro foram apresentados. Sugere-se que a permanência destes insetos fora do abrigo deva-se a alta motivação dos mesmos por localizar o hospedeiro. Entretanto, as ninfas que retornaram ao abrigo mostraram uma tendência de fazê-lo nas últimas horas de fase escura.

Um conhecimento mais profundo da fisiologia sensorial e do comportamento de *R. prolixus* possibilitaria o desenvolvimento de novos métodos de controle de suas populações. O estudo da maneira com que estes insetos fazem uso da informação proveniente do ambiente pode contribuir para o desenho de armadilhas e iscas dirigidas à captura e controle destes insetos. Este trabalho adiciona informações sobre o comportamento desta espécie, mostrando que a presença de pistas do hospedeiro, odores, promove uma maior atividade de saída dos abrigos e um aumento da atividade locomotora de *R. prolixus*. Além disso, os resultados mostram que esses sinais promovem uma intensa locomoção na procura da sua fonte. No entanto, sugere-se a realização de novos estudos a fim de determinar se outras pistas emitidas pelos hospedeiros, i.e., vibrações, seriam capazes de disparar uma atividade de saída dos abrigos mais intensa. Adicionalmente, os resultados mostram que é necessário caracterizar a identidade química das substâncias emitidas pelos hospedeiros que promoveram os efeitos aqui descritos.

6.2 Capacidade de *R. prolixus* em avaliar a distância a qual se encontra uma fonte de calor

R. prolixus é capaz de avaliar a distância a que se encontra uma fonte térmica sem contato físico com a mesma. Esta capacidade ficou particularmente evidenciada através dos ensaios nos quais os insetos caminharam livremente até a fonte. O disparo do PER a distâncias próximas da fonte, e sem contato com a mesma, demonstra que os insetos percebem a presença próxima de um hospedeiro potencial. Os resultados mostram que a maioria dos insetos estima que alcançaram o hospedeiro quando se encontram a aproximadamente 5 mm da fonte. É interessante ressaltar que as antenas destes insetos têm 5 mm de comprimento, enquanto o rosto tem um comprimento aproximado de 3 mm. Portanto, tal estimativa de distância para disparo do PER ocorre imediatamente antes do contato físico do inseto com o seu hospedeiro. Desta maneira, ao mesmo tempo em que estendem o rosto, os insetos continuam a sua locomoção e, seguidamente, contactam o hospedeiro com o mesmo. A fase na qual os insetos inserem as peças

buciais na derme e as movimentam em busca de vasos sanguíneos é denominada de contato ou sondagem (Friend & Smith, 1971). Desta forma, esta fase é importante na interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros, uma vez que o comportamento de defesa dos hospedeiros pode reduzir o sucesso alimentar e a sobrevivência do inseto. Isto é particularmente importante para aqueles artrópodes que, ao longo de suas vidas, necessitam alimentar-se repetidas vezes sobre os hospedeiros, como é o caso dos triatomíneos. Desta forma, a expressão do PER, antes do contato com o hospedeiro, talvez tenha alguma relevância evolutiva para os triatomíneos. Isto porque este comportamento pode adiantar o contato dos insetos com o hospedeiro. Desta forma, diminui o tempo de contato dos insetos com os hospedeiros e, conseqüentemente, é minimizado o risco do inseto ser percebido e morto pelo seu hospedeiro. No entanto, novos ensaios necessitam ser realizados a fim de esclarecer tal questão.

A variação da frequência de expressão do PER apresentada pelos insetos em função da distância à fonte em condições de *closed loop* foi diferente daquela apresentada em condições de *open loop*. Isto sugere que o processo de aproximação dos insetos é relevante para uma correta avaliação da distância à fonte térmica. A maioria dos insetos mantidos em condições de *closed-loop* realizou o PER antes de qualquer contato físico com a fonte. Desta forma, o deslocamento dos insetos durante a fase final de aproximação, aparentemente, lhes permite detectar mudanças transientes na quantidade de energia radiante que os estimula. Nos ensaios em que os insetos não podiam se aproximar da fonte térmica (*open-loop*), estes normalmente usaram pistas mecânicas antes de expressar o PER. Desta forma, sugere-se que insetos impedidos de se deslocar até a fonte não conseguem detectar o aumento da quantidade de calor conseqüente da aproximação, e, assim, realizarem uma estimativa correta da distância à que se encontra esta fonte.

Flores (2001), propõe várias hipóteses que explicariam o mecanismo através do qual os triatomíneos perceberiam o calor de uma fonte térmica a longa distância. Os triatomíneos poderiam comparar informações térmicas sucessivas e simultâneas varrendo o ambiente com as antenas e comparando as entradas por triangulação. A variação na estimulação térmica conseqüente das diferentes distâncias a que as antenas se encontram da fonte poderia aportar suficiente informação para estimar a distância da mesma. Entretanto, segundo a autora, os movimentos antenais dos insetos, quando suspensos, não parecem suficientemente amplos em relação a

distância à fonte, de forma a conseguir estabelecer a distância a que esta se encontra. Outra hipótese alternativa é que os triatomíneos poderiam estimar a distância à que se encontra a fonte térmica através da diferença de calor percebida em diferentes pontos do corpo como, por exemplo, entre cabeça e extremo posterior do abdômem. Segundo a autora, isto seria possível uma vez que os termorreceptores não se encontram restritos às antenas. Mas, para tal, os termorreceptores extra-antenas deveriam ser capazes de assumir a função daqueles localizados nas antenas e as informações vindas de ambos serem integradas. Apesar disto, não há dados na literatura que mostrem que os termorreceptores extranatenais participem do reconhecimento do calor do corpo do hospedeiro.

No nosso estudo, a temperatura da fonte de calor não influenciou a distância de expressão do PER, indicando que a temperatura não afeta a distância em que o PER é expresso em triatomíneos. Estes resultados são interessantes, uma vez que a fonte a 35 °C possui numa temperatura próxima à de um mamífero, enquanto a fonte a 40 °C tem temperatura próxima à de uma ave. Sabe-se que os triatomíneos são capazes de se alimentar de sangue de aves e mamíferos. Desta forma, parece adequado que a distância a qual estes insetos realizem o PER seja independente do tipo de hospedeiro. Além disto, há outros contextos comportamentais nos quais a temperatura absoluta de uma fonte térmica não influencia a resposta dos insetos. Nos ensaios realizados por Ferreira *et al* (2007) foi demonstrado que os insetos apresentam um comportamento de picada similar diante de fontes térmicas lineares apresentadas a diferentes temperaturas. Nestes ensaios, em ambos os gradientes de temperatura testados, os insetos preferiram picar objetos cuja temperatura era mais alta que a do fundo, independentemente dos valores absolutos.

A pista mecânica influenciou a probabilidade de disparo do PER sob algumas das condições experimentais testadas. Isto se fez evidente quando a percepção do calor foi limitada pela falta de uma antena (série em *closed-loop*) ou pela dinâmica de estimulação (série em *open-loop* com insetos intactos). Quando as antenas dos insetos intactos foram estimuladas mecanicamente em simultâneo com a estimulação térmica em condições de *open-loop* a 10 e 8 mm da fonte, não houve respostas de PER. Sugere-se que o estímulo térmico nessa distância indica inequivocamente que o hospedeiro não está próximo. Entretanto, quando o estímulo mecânico foi apresentado a insetos que se encontravam a 6 mm da fonte térmica, o PER foi expresso. Sugere-se que nesta distância a informação térmica indica ao

inseto a presença contígua de um hospedeiro. Nesta condição, a estimulação mecânica atua como um co-estímulo que contribui para reforçar a percepção da proximidade do hospedeiro. Estes dados sugerem que o limiar de distância indicado pela estimulação térmica no qual os insetos determinam o momento adequado para estender seu rosto deve estar entre 6 e 5 milímetros da fonte de calor. A apresentação da estimulação mecânica isolada foi ineficaz para disparar o PER em insetos intactos.

Uma alta proporção dos insetos antenectomizados expressaram o PER a 8 e 10 mm da fonte térmica quando a antena intacta foi estimulada mediante um toque. Desta forma, observou-se que os insetos antenectomizados sob estimulação térmica e mecânica simultâneas responderam ao calor a distâncias maiores do que os insetos intactos. Ainda, a estimulação mecânica foi capaz de promover a expressão do PER nos insetos antenectomizados, mesmo quando apresentada isoladamente. Diante destes resultados, sugere-se que a ablação de uma antena leve à perda da capacidade de integração bilateral das informações térmicas que é necessária para a determinação adequada da distância à fonte. Provavelmente, como consequência dessa incapacidade, o inseto não consegue determinar a distância à fonte de calor de maneira precisa e, portanto, é possível que isto mude as relações hierárquicas entre os diversos estímulos sensoriais utilizados na detecção e procura do hospedeiro. Assim, essa manipulação provavelmente liberou a expressão do PER frente a estímulos de modalidades sensoriais incapazes de fazê-lo em condições normais. De fato, Wigglesworth & Gillet (1934) já haviam descrito que *R. prolixus* antenectomizados unilateralmente apresentam maior sensibilidade a vibrações.

Em baratas, os cercos são estruturas que contêm grande quantidade de mecanorreceptores envolvidos na percepção de estímulos que disparam o comportamento de fuga (Roeder, 1998). Recentemente, demonstrou-se que mecanorreceptores presentes no flagelo antenal destes insetos percebem estímulos envolvidos em diversos contextos comportamentais, inclusive em situações de fuga (Okada & Toh, 2000). Os receptores antenais de baratas são responsáveis pela percepção de movimentos do ar, bem como de outras propriedades físicas do ambiente e de objetos e medeiam nestes insetos respostas de escape (Okada & Toh, 2000). Nos triatomíneos, o flagelo antenal apresenta um importante número de mecanorreceptores (Catala & Schofield, 1994; Carbajal de la Fuente & Catala, 2002). De acordo com os resultados do presente trabalho, sugere-se que os

mecanoreceptores presentes na antena dos triatomíneos poderiam estar diretamente envolvidos na percepção tátil dos hospedeiros, que reforçaria a expressão do PER. Sugere-se que o uso da pista mecânica na detecção do hospedeiro pelos triatomíneos seria uma capacidade herdada de ancestrais predadores. Isto porque se sabe que a mecanorecepção em insetos predadores é uma pista usada na localização de suas presas. Inclusive em alguns a percepção de estímulos vibratórios pelas antenas e patas pode determinar a projeção de órgãos especializados, como a cabeça em odonatas (Bernard, 1974). No entanto, devida a complexidade desta questão, a realização de ensaios é imprescindível para a conclusão de tal hipótese.

Interessantemente, o PER foi expresso a distâncias maiores em insetos antenectomizados unilateralmente do que em insetos intactos. Isto foi particularmente evidente nas séries realizadas em *open-loop*. Essa distribuição do PER em função da distância à fonte parece indicar que os insetos antenectomizados sofrem uma perda de precisão na estimativa de distância. O fato de que não foram observados contatos da antena intacta com a fonte antes da expressão do PER em insetos antenectomizados, é provavelmente consequência da expressão do PER a distâncias maiores nestas condições. Esses resultados indicam que a integração bilateral da informação térmica é fundamental para uma correta determinação da distância entre o inseto e a fonte.

Os insetos antenectomizados bilateralmente não mostraram respostas quando confrontados com estímulos térmicos. Desta forma, os receptores sensoriais das antenas parecem ser indispensáveis na percepção do calor que antecede à orientação ao hospedeiro e o PER. Diante destes resultados, propõe-se que somente os termoreceptores das antenas estariam envolvidos na detecção do hospedeiro e posterior orientação ao mesmo em *R. prolixus*.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se a relevância da atividade locomotora dos insetos no processo de estimação da distância ao hospedeiro. Na ausência de locomoção, a percepção do calor e a conseqüente avaliação da distância são comprometidas. Sob esta condição, i.e., *open loop*, a hierarquia relativa entre o peso das informações térmicas e mecânicas para determinar a posição do hospedeiro parece alterada, e assim, o PER é expresso em condições diferentes do observado em insetos livres. Da mesma forma, a ausência de uma das antenas gera uma perda da capacidade de estimação de distância da

fonte e conseqüente expressão do PER. A perda da capacidade de estimar a distância à fonte nos insetos antenectomizados seria aparentemente decorrente da falta de integração de informações térmicas detectadas por ambos órgãos sensoriais. Logo, na impossibilidade de realizar tal integração, o inseto antenectomizado também parece atribuir maior relevância para a localização do hospedeiro - e conseqüente expressão do PER, às informações obtidas via mecanorreceptores. Contudo, nossos resultados não permitem descartar que outras modalidades sensoriais, tais como a visão, possam ter algum papel no desencadeamento da expressão do PER, sendo necessários novos estudos a fim de esclarecer tal questão.

6.3 Mecanismos que medeiam o correto direcionamento das picadas na pele do hospedeiro em *R. prolixus*

A integração bilateral das informações termo-sensoriais das antenas é necessária para guiar corretamente as tentativas de picada a fontes lineares, de maneira semelhante ao que acontece durante o processo de aproximação dos insetos a uma fonte térmica (Wigglesworth & Gillet, 1934; Flores & Lazzari, 1996). Como conseqüência da abolição de uma das entradas sensoriais pela antenectomização unilateral, os insetos erram sistematicamente o direcionamento do rosto ao alvo, endereçando a maior parte de suas primeiras picadas ao lado da fonte térmica linear associado à antena intacta. Estes resultados sugerem fortemente que os termorreceptores localizados nas antenas são responsáveis pela localização dos vasos sanguíneos. Além disto, este experimento revela que um mecanismo de termo-tropotaxia guia o direcionamento do reflexo de extensão do rosto no ato da picada. *Tropotaxia* é um mecanismo de orientação através do qual compara-se as entradas de órgãos bilaterais.

Os insetos antenectomizados bilateralmente não estenderam seu rosto frente a fontes de calor, confirmando o observado por Wigglesworth & Gillet (1934) e Flores (2001). Três hipóteses podem ser propostas para explicar esse fenômeno como resultante da antenectomia bilateral. A primeira é o fato de que a antenectomia afetaria o comportamento normal dos insetos, de modo que estes deixariam de apresentar respostas a alguns estímulos. A segunda hipótese é que o rosto possuiria termorreceptores, mas que somente a antena guiaria a picada. E a terceira indica que haveria uma falta de termorreceptores no rosto de *R. prolixus*. A primeira

hipótese é suportada por trabalhos que demonstraram que a antenectomia afeta profundamente o comportamento normal dos insetos. Os insetos param de responder aos objetos quentes, não se aproximando destes e mudando para o acompanhamento visual do movimento dos objetos, estendendo sua probóscide frente a objetos em deslocamento (Wigglesworth & Gillet, 1934). A segunda hipótese parece ser a menos provável, uma vez que é difícil considerar que a função de termo-higroreceptores do rostro possa estar dissociada da picada e da alimentação. Em relação à terceira hipótese, a existência de sensilas coelocônicas termo-higrosensitivas na probóscide tem sido proposta, mas não conclusivamente mostrada (Bernard, 1974; Catalá, 1996) até o presente estudo, no qual evidenciou-se a ausência de termoreceptores no rostro de *R. prolixus* (conferir capítulo 4).

Os insetos antenectomizados bilateralmente, aparentemente, mostraram uma tendência a permanecer sobre a fonte térmica, apesar de não picá-la. Devido ao modelo de apresentação do estímulo, ou seja, a fonte colocada no solo da arena estima-se que os insetos chegaram ao acaso até a fonte, já que esta não subtende radiação significativa para as laterais. No entanto, a decisão de permanecer sobre a mesma sugere que os insetos têm termoreceptores espalhados pelo corpo, que influenciariam o posicionamento dos insetos. Desta forma, os dados sugerem que os triatômíneos possuiriam termoreceptores em outras regiões do corpo, para além das antenas e, como consequência disso, a antenectomia não é capaz de abolir completamente a sensibilidade térmica dos insetos (Flores, 2001; Lazzari, 1992). De todas as maneiras, esses outros termoreceptores não seriam capazes de mediar a orientação ao hospedeiro ou o direcionamento das picadas.

Os insetos que tiveram uma das antenas retiradas realizaram um número menor de picadas sobre a fonte térmica. Esta alteração pode ter ocorrido devido à diminuição do número de termoreceptores, gerando uma percepção do calor alterada e, conseqüentemente, uma alteração na resposta a este estímulo. Outra possível explicação é que a perda da integração bilateral da informação térmica pode alterar a motivação para expressar o comportamento de picada nos insetos.

A partir de observações é possível sugerir que durante os contatos prolongados, os insetos realizaram uma sondagem, movimentando os estiletes e tocando a fonte térmica linear com as peças bucais. O mencionado toque da fonte linear à distância era possível, devido ao fato de que as maxilas de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* podem se estender para fora da probóscide entre 1 e 5 mm

(Friend & Smith, 1971). Sabe-se que há receptores sensoriais presentes nos estiletes mandibulares e maxilares de *R. prolixus*, que são sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos (Pinet, 1970). Logo, hipotetiza-se que, durante a movimentação dos estiletes, os insetos poderiam sondar informações em busca de um vaso sanguíneo. Tal hipótese deve ser esclarecida, uma vez que não há informações na literatura que confirmem que tais receptores ajudem a guiar os estiletes até o encontro com os vasos sanguíneos.

Apesar do número total de contatos do rostro dos insetos ter mudado com a retirada de uma antena, a mesma redução não foi verificada no número de contatos prolongados. Logo, a ausência de uma das antenas não afetaria a “decisão” do inseto de penetrar o tecido com suas peças bucais, uma vez detectadas pistas mecânicas que medeiam o reconhecimento da textura da pele. Desta forma, sugere-se que o rostro é uma estrutura relevante nesta etapa do comportamento de picada, tendo receptores envolvidos na percepção de pistas mecânicas tais como textura.

Surpreendentemente, os insetos antenectomizados concentraram os contatos prolongados mais próximos da fonte térmica linear do que os insetos com antenas intactas. Estes resultados reforçam a hipótese de que os insetos mostram uma preferência por picar locais com contrastes ou gradientes de temperatura, pois, provavelmente, para os insetos, estes locais simulam a presença de vasos sanguíneos de grande calibre.

Conforme discutido acima, a diminuição no número de termoreceptores, ou, alternativamente, a perda da capacidade de integrar bilateralmente as informações térmicas nos insetos antenectomizados, provavelmente diminuiu a motivação dos insetos para realizarem picadas na fonte. Sugere-se que estas mesmas hipóteses possam também ser as responsáveis pela diminuição da duração dos contatos prolongados em insetos antenectomizados. Desta forma, propõe-se que as antenas possuam um papel fundamental na percepção do calor proveniente dos vasos sanguíneos antes e durante a etapa de sondagem e, conseqüentemente, os estiletes maxilares talvez teriam um papel menor na percepção do calor durante a fase de sondagem. Observações pessoais permitem afirmar que as antenas são movimentadas pelos insetos de maneira frequente, tanto durante a aproximação ao hospedeiro, quanto no ato da picada e até no início da fase de ingurgitação. A partir dessa fase, as antenas são direcionadas para a região posterior da cabeça e permanecem imóveis nessa posição enquanto essa fase da alimentação se estende.

Sugere-se ainda que o rostro teria um papel relevante na obtenção de informação mecânica que medeia a decisão de penetrar ou não o substrato com as peças bucais.

6.4 Caracterização de estruturas sensoriais do rostro e antena de *R. prolixus* e suas projeções dentro do SNC

As peças bucais de muitos insetos possuem diferentes tipos de receptores sensoriais. Na maioria dos insetos, são estruturas capazes de movimentação, o que influi diretamente na sua capacidade de avaliação da textura e composição química da superfície de objetos antes e durante a alimentação. O presente estudo revela detalhes morfológicos do rostro de *R. prolixus*, além de ser o primeiro estudo a descrever projeções de neurônios rostrais no SNC de um triatomíneo.

Sugere-se que os mecanoreceptores presentes no rostro de *R. prolixus* sejam de grande relevância durante a fase prévia à inserção dos estiletes dentro da derme do hospedeiro. Possivelmente, tais estruturas sejam importantes para detectar o contato do rostro com a pele do hospedeiro e também para a manutenção deste contato (Bernard, 1974). O papel dos químio-receptores do extremo do rostro não seria tão crítico, visto que os triatomíneos picam até mesmo membranas artificiais ou metais, desde que estes sejam mantidos à temperatura semelhante a do corpo de vertebrados (Bernard, 1974; Flores & Lazzari, 1996). Porém, a sua potencial função no reforço do reconhecimento da pele e na manutenção da picada, uma vez iniciada por outros estímulos aqui descritos, precisa ser determinada.

A existência de sensilas coleocônicas termo-higroreceptoras no rostro de triatomíneos tem sido sugerida, mas até o momento não existem dados conclusivos sobre isto (Catalá, 1996; Bernard & Gillet, 1974). Entretanto, no presente estudo verificou-se que não há nenhuma estrutura que se assemelhe a sensilas coleocônicas do tipo termo-higroreceptor no rostro de *R. prolixus*. Desta forma, somente as antenas seriam responsáveis pela percepção de informações térmicas durante a escolha do sítio de picada no hospedeiro. Sugere-se que o rostro tenha um papel importante somente após o contato com a fonte alimentar, isto é, na etapa subsequente à orientação.

O arranjo e posicionamento das estruturas internas do rostro foram evidenciados conforme o esperado, ou seja, não foi verificada nenhuma variação no posicionamento das estruturas entre os três segmentos do rostro.

Interessantemente, os nervos rostrais somente foram visíveis após o primeiro terço do segmento rostral distal. Supõe-se que, à medida que se avança ao longo do rostro em sentido proximal, a junção dos axônios oriundos das distintas sensilas forma os nervos labiais (pares) e os torna mais largos. O grande volume de tecido muscular encontrado dentro do rostro também é esperado, uma vez que tal apêndice possui uma grande capacidade de movimentação.

Nossos resultados confirmam que as projeções de neurônios do rostro de *R. prolixus* chegam pelo par de nervos labiais. Adicionalmente, nossos dados demonstram que os axônios de tais neurônios se projetam diretamente em diversas regiões dos gânglios subesofágico, protorácico e posterior. Sugere-se que a maior parte de tais fibras seja originada em sensilas mecanoreceptoras, visto que há grande quantidade destas sensilas no rostro destes insetos. Aliás, projeções de fibras de mecano e quimiorreceptores no gânglio subesofágico são características de um grande número de insetos. Projeções de neurônios gustatórios das peças bucais no gânglio subesofágico e no tritocérebro foram descritas para uma variedade de insetos (Singh & Nayak, 1985; Rehder, 1989; Mitchell & Itagaki, 1992; Edgecomb & Murdock, 1992). Em relação a neurônios mecanoreceptores das peças bucais, antenas, pêlos da cabeça e apêndices, há relatos de projeções ao gânglio subesofágico (Mitchell *et al.*, 1999; Kent & Hildebrand, 1987). A fim de determinar o arranjo das projeções das fibras mecano e quimiorreceptoras no SNC de *R. prolixus*, tentou-se isolar pêlos individuais para realizar a difusão de corantes marcadores nestas estruturas. Entretanto, tal procedimento mostrou-se inviável, aparentemente devido ao pequeno tamanho dos pêlos. Portanto, a marcação de neurônios com corantes somente pode ser realizada através da lesão dos nervos labiais inteiros, com a conseqüente marcação concomitante, de alguns neurônios motores que controlam a musculatura do rostro.

Não foi verificada uma diferença nas projeções de neurônios provenientes do rostro de ninfas de 5º estágio com aquelas dos adultos. Tal resultado é esperado, uma vez que se trata de uma estrutura dedicada fundamentalmente ao processo alimentar - e as ninfas possuem o mesmo hábito alimentar dos insetos adultos. Além disso, também não foram visualizadas diferenças nas projeções provenientes de cada um dos três segmentos do rostro. Isto provavelmente sugere que ao longo do rostro encontram-se os mesmos tipos de receptores, neste caso químico e principalmente mecanoreceptores.

A análise dos preparados com neurobiotina e rodamina confirmou o mesmo arranjo visto mediante a técnica de marcação com cloreto de cobalto. Entretanto, nos preparados realizados com rodamina foi possível visualizar com maior nitidez a presença de corpos celulares presentes no gânglio sub-esofágico. Sugere-se que tais corpos celulares sejam pertencentes a neurônios motores, provavelmente responsáveis pelo controle da extensão do rostro.

Rajashekhar & Singh (1994) demonstraram, em *Drosophila melanogaster*, que o tritocérebro e o gânglio subesofágico são responsáveis pela percepção de gosto e também pelo controle motor das peças bucais. Interessantemente, em *R. prolixus* não foi visualizada nenhuma fibra que ascenda a centros superiores do SNC. Desta forma, parece que para este inseto as informações sensoriais percebidas pelos receptores presentes no rostro chegam primeiramente no gânglio subesofágico e de forma secundária aos gânglios protorácico e posterior. O controle motor das peças bucais parece ocorrer fundamentalmente no gânglio sub-esofágico. Através da técnica utilizada não é possível visualizar interneurônios, sendo assim não se descarta a possibilidade de existirem tais células que levem informações do gânglio subesofágico ao cérebro.

Aparentemente, não houve diferenças evidentes entre as projeções oriundas de receptores sensoriais das antenas de ninfas de 5º estágio com aquelas evidenciadas em insetos adultos por Barrozo *et al* (2008). Tal diferença poderia ocorrer uma vez que as antenas são apêndices que possuem receptores envolvidos na percepção de odores e feromônios sexuais e as ninfas ainda não respondem a tais odores. Entretanto, para concluir tal questão, são necessários novos estudos que possam evidenciar o arranjo das fibras no lóbulo antenal das ninfas para compará-lo com o observado em insetos adultos.

Não foi possível confirmar a existência de uma área de convergência das fibras das antenas com as do rostro. Isto provavelmente é devido à grande quantidade de fibras originadas em cada um dos apêndices que apresentavam projeções em áreas comuns, dificultando a individualização e separação entre as fibras das antenas e do rostro. Desta forma, o emprego de outras técnicas, tais como a dupla injeção de corantes diferentes pelo rostro e antenas, mostra-se necessária para responder a questão.

7 Considerações finais

Nesta tese foram analisados aspectos que contribuíram com o conhecimento relacionado com a série de complexos comportamentos que ocorrem durante a noite quando um triatomíneo busca alimento. Desta forma, neste trabalho estudamos passos que vão desde o momento da ativação e saída dos triatomíneos dos seus abrigos, demonstrando que em *R. prolixus* esta ativação acontece em resposta a odores emitidos pelo hospedeiro, até a orientação a curta distância destes insetos às suas fontes de alimento, que é mediada fundamentalmente pela radiação infravermelha emitida pelo corpo dos hospedeiros (Lazzari & Núñez, 1989; Schmit, 2000). Também, foram estudados os mecanismos que facilitam o encontro dos vasos sanguíneos na pele do hospedeiro, bem como se caracterizaram aspectos comportamentais relacionados com esta fase de seleção do local de alimentação. Além disto, avaliou-se o papel das antenas e do rosto que concentram na sua superfície um grande número de órgãos sensoriais, na detecção de informações relevantes para a seleção de locais apropriados para os insetos picarem. E por fim analisamos aspectos da anatomia funcional destes insetos que pudessem estar envolvidos na percepção e processamento dos sinais sensoriais relacionados com a escolha dos locais de picada.

A Figura 46 (adaptada de Guerenstein & Lazzari, 2008) resume os diversos tipos de comportamentos que podem ser desenvolvidos pelos triatomíneos.

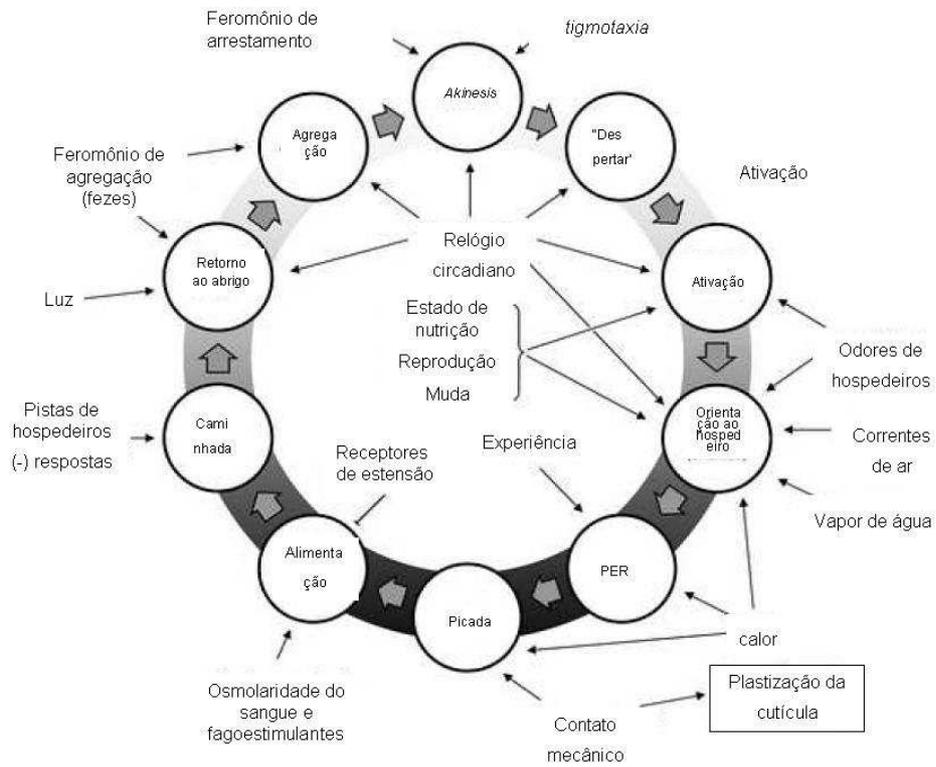


Figura 46: Diagrama da série de eventos que ocorrem numa noite típica de alimentação de um triatômico. Neste, estão indicados os efeitos endógenos ou motivacionais (lado interno do círculo) e exógenos (lado externo do círculo), fatores que promovem ou modulam os diferentes componentes do comportamento destes insetos. (Adaptado de Guerenstein & Lazzari, 2008).

Os triatomíneos, particularmente aquelas espécies associadas aos ambientes humanos, passam a maior parte do tempo em estado de *akinesis* dentro de seus refúgios. Desta forma, o primeiro objetivo deste trabalho foi estudar se odores liberados pelo hospedeiro seriam capazes de ativar a saída dos insetos de dentro dos seus abrigos e subsequentemente, a sua locomoção. Observou-se que saídas espontâneas do abrigo não são frequentemente observadas em *R. prolixus* mesmo em jejuns prolongados. Apesar disso, foi possível evidenciar que quando há saídas de insetos, estas ocorrem preferencialmente durante as primeiras horas da escotofase. Aparentemente, *R. prolixus* somente deixa os abrigos quando se encontra em extremo jejum e diante de sinais da presença do hospedeiro, tais como odores. Sugere-se que esta resistência a deixar os abrigos seja adaptativamente importante, uma vez que os insetos não exporiam-se a predação. Este fato é consistente com a alta tolerância ao jejum desta espécie, que de acordo com os nossos dados, aparentemente não sai à procura de hospedeiros sem detectar sinais dos mesmos, e ainda assim não parece ver afetada a sua sobrevivência. Possivelmente, além dos odores, outras pistas adicionais poderiam melhorar ou mesmo atuar sinergicamente promovendo a saída dos insetos dos abrigos. Sugere-se, então, que novos estudos são necessários para esclarecer tal questão.

Após deixarem os abrigos, ativados pelas pistas químicas provenientes do hospedeiro, os insetos apresentam intensa atividade locomotora. Logo, nesta fase, pistas de outras modalidades sensoriais, como por exemplo, a direção do movimento de correntes de ar (Núñez, 1982; Guerenstein & Guerin, 2001; Barrozo & Lazzari, 2004), o calor emitido pelo corpo do hospedeiro (Lazzari & Núñez, 1989; Schmit, 2000) e, ainda, o vapor de água (Barrozo *et al*, 2003) poderiam ser detectadas e usadas pelos insetos para direcionar a sua aproximação à fonte. Provavelmente, os insetos encontram o hospedeiro ainda nas primeiras horas da fase escura. Quando próximos ao hospedeiro, o calor radiante emitido pelo corpo do mesmo é capaz de disparar a resposta de extensão rostral (PER). Sobre esta etapa do comportamento de orientação ao hospedeiro, este trabalho reforça estudos anteriores que demonstram que os triatomíneos são capazes de estimar a

distância a que se encontra uma fonte térmica e, portanto, os seus hospedeiros de sangue quente. Em *R. prolixus*, a expressão do PER acontece fundamentalmente a partir de 5 mm de distância da fonte térmica. Desta forma, a extensão do rostro nestas circunstâncias sugere que a partir dessa distância o inseto sabe que irá atingir o hospedeiro se estender o rostro. Contudo, os insetos necessitam deslocar-se livremente até uma fonte térmica para poder estimar corretamente a distância à mesma. Sugere-se que, somente através do deslocamento, os insetos consigam medir as mudanças na intensidade da energia radiante vinda do hospedeiro, e, assim, realizarem a estimativa de distância da fonte.

Interessantemente, neste trabalho demonstrou-se que a distância de disparo do PER é a mesma, independente da temperatura da fonte (35 ou 40 °C). Tais temperaturas são próximas às do corpo de mamíferos e aves, respectivamente. Além disto, *R. prolixus* é capaz de se alimentar tanto em aves como em mamíferos, sendo assim o comportamento apresentado pelos insetos de resposta a fonte é consistente. Além disto, demonstrou-se que estímulos mecânicos têm um papel como pista sensorial complementar que, integrada as pistas térmicas, é capaz de afetar o desencadeamento do PER em triatomíneos. Dependendo das condições nas quais os insetos se encontram, os estímulos detectados pelos mecanorreceptores poderão assumir uma grande relevância para mediar o comportamento de picada, que poderá ser tão ou mais importante que o da estimulação térmica. Por exemplo, a estimulação mecânica foi capaz de promover o PER em insetos antenectomizados ou impossibilitados de caminhar até a fonte. Este é o primeiro estudo que demonstra que insetos hematófagos usam a modalidade mecânica como pista desencadeadora da resposta de picada. Sugere-se que o uso de tal modalidade possivelmente seja derivado da capacidade de utilizar pistas mecânicas dos reduvídeos predadores, prováveis ancestrais dos triatomíneos. Isto porque insetos predadores, freqüentemente utilizam vibrações transmitidas pelo substrato e outras pistas mecânicas na localização de suas presas.

Uma vez que os insetos se encontram diante dos hospedeiros e o PER já foi desencadeado, é necessário encontrar um local adequado para picar e localizar

um vaso sanguíneo. Sabe-se que, sem contato prévio do rosto com a pele do hospedeiro, os triatomíneos são capazes de detectar descontinuidades de temperatura nos objetos quentes e que utilizam essas informações para direcionar as suas picadas. Esta capacidade, aparentemente, seria parte central do mecanismo utilizado para localizar os vasos sanguíneos (Ferreira *et al*, 2007).

Investigações adicionais sobre esta fase da orientação ao hospedeiro, constataram primeiramente que, na superfície do rosto de *R. prolixus*, não há sensilas semelhantes àquelas classificadas normalmente como termo-receptores (Ferreira *et al*, 2007). Desta forma, este órgão aparentemente não está envolvido na percepção das descontinuidades térmicas existentes entre os vasos sanguíneos e a pele do hospedeiro. Por meio de experimentos de comportamento, demonstrou-se que as antenas, que segundo autores prévios apresentam grande densidade de termoreceptores, são capazes de detectar essas descontinuidades térmicas sobre a pele do hospedeiro. A integração bilateral das informações detectadas por ambas as antenas é necessária para guiar corretamente as tentativas de picadas dos insetos. Além desta função, mostrou-se que as antenas também teriam um papel relevante durante a fase de sondagem, ou seja, de busca dos vasos sanguíneos de grande calibre no interior da pele. Aparentemente, as informações detectadas pelas antenas modulam a dinâmica da busca dos vasos sanguíneos no interior da pele do hospedeiro. Desta forma, estes órgãos são relevantes na obtenção de informações durante a orientação dos insetos ao hospedeiro, após o contato destes com a pele e, finalmente, também durante a fase de sondagem. Entretanto, não descarta-se a hipótese de que os estiletes maxilares possuem algum papel no encontro dos vasos dentro da derme. Logo, futuros estudos são necessários para esclarecer melhor esta questão.

Demonstrou-se que o contato tátil do rosto com um objeto que apresente a mesma textura da pele do hospedeiro evoca a inserção das peças bucais, os estiletes, no substrato (membrana de látex) ou pele. De acordo com os resultados apresentados nesta tese, sugere-se que o rosto esteja envolvido na aquisição de informações relevantes para mediar a “decisão” de penetrar o substrato com as peças bucais. Através de microscopia eletrônica de varredura, evidenciou-se que

no rosto de *R. prolixus* há grande quantidade de mecanoreceptores e um número relevante de quimiorreceptores. Sugere-se que os mecanoreceptores sejam importantes para avaliar as propriedades mecânicas do substrato a ser picado. Esta afirmação é apoiada pelos resultados obtidos nos ensaios de comportamento de picada, já que os mesmos evidenciaram que, somente quando a placa metálica aquecida foi coberta com uma membrana de látex, os insetos arrastaram o extremo do rosto sobre a superfície. Desta maneira, é provável que através deste comportamento os insetos avaliem propriedades físicas do substrato, uma vez que a textura do látex pode assemelhar-se à da pele de um hospedeiro. Uma vez que os estiletes encontram-se dentro da derme do hospedeiro, hipotetiza-se que os seus neurônios sensoriais possam mediar a localização dos vasos sanguíneos. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados para esclarecer tal questão.

Nesta tese também se estudaram as vias nervosas presentes no rosto e antenas, duas importantes estruturas envolvidas diretamente na percepção de vários dos diferentes estímulos associados ao hospedeiro. Observou-se, conforme já demonstrado em outros grupos de insetos, que as projeções dos neurônios do rosto de *R. prolixus* projetam-se diretamente no gânglio subesofágico. Sugere-se que, provavelmente, a maioria destas projeções seja de mecano e quimiorreceptores. Evidenciaram-se também projeções de neurônios oriundos das antenas no SNC de triatomíneos. Há aparentes áreas em comum entre as fibras oriundas do rosto e antena. No entanto, não se sabe se existem conexões entre as sípnases destes órgãos com interneurônios em comum. Sugere-se a continuidade destes estudos, uma vez que se espera encontrar áreas de convergência entre projeções destes órgãos que possam mediar a integração das informações correspondentes. Uma possibilidade é realizar difusões simultâneas de rodamina e neurobiotina nos dois órgãos, respectivamente, de forma que cada corante marque as fibras de uma determinada origem. Posteriormente, estes preparados devem ser analisados sob microscópio confocal para reconstrução em três dimensões das potenciais áreas de integração dentro do SNC.

Após deixar seus abrigos, localizar o hospedeiro e se alimentar, os insetos tendem a retornar aos abrigos para se protegerem de predadores. Entretanto, aparentemente, isto não acontece imediatamente após a alimentação. Os triatomíneos sofrem uma copiosa diurese após a alimentação (Wigglesworth 1931) e somente retornam aos abrigos após a diurese no final da noite (Lorenzo MG, comunicação pessoal) orientados por marcas químicas presentes nas fezes secas localizadas próximas das entradas dos abrigos (Lorenzo & Lazzari, 1996).

Pretende-se que as conclusões deste trabalho sejam úteis para a compreensão de aspectos relacionados ao comportamento alimentar dos triatomíneos, desde o momento de sua saída do abrigo até o início da alimentação. Além disto, espera-se com este trabalho levantar novas questões a serem esclarecidas e aprofundadas por trabalhos futuros que possam transferir conhecimentos sobre a ecologia sensorial destes insetos para melhorar as estratégias de controle.

8 Anexos

8.1 Anexo I

Tampões

Tampão fosfatado (segundo Millong, 1961)

a) Tampão *Milloning's*:

Solução A do tampão: 2,26% de $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$

Solução B do tampão: 2,52% de NaOH

Para se preparar o tampão misturar 83,9ml de solução A + 16,1ml de solução B + 1,3 g sacarose. Ajustar para pH 7,3 com ClH ou HoNa, conforme o necessário.

b) Tampão especial

Tampão padrão + 2.2 g d-glicose por 100 ml + 0.9 1% $\text{CaCl}_2/100\text{ml}$.

Fixador

a) Fixador padrão

Dissolver 2 g de paraformaldeído em 17 ml de solução B do tampão *Milloning's*, colocar uma barra magnética dentro de um frasco e deixar agitando em banho do tampão *Milloning's*. Adicionar 10ml glutaraldeído 25%. Finalmente ajustar a pH 7.3

b) Fixador especial

- adicionar ao fixador padrão 2.2g de d-glicose/100ml + 0.9 ml 1% CaCl_2

c) Fixador a base de tetróxido de osmium

- usar 1-2% OsO_4 colocado em um tampão padrão.

8.2 Anexo II

Durcupan

ACM Electron Microscopy Sciences nº 14040

Durcupan duro

Componente A 11,3 g

Componente B 10,0 g

Componente C 0,2 g

Componente D 0,5 g

Misturar em agitador magnético os componentes A e B por 5 a 10 min. Acrescentar o componente D e agitar por 30 min. Acrescentar o componente C e agitar por 1 h. Guardar em seringas de 2 a 5 ml (uma porção) no freezer.

Durcupan suave

Componente A 10,8 g

Componente B 8,9 g

Componente C 0,5 g

Componente D 0,8 g

Misturar em agitador magnético os componentes A e B por 5 a 10 min. Acrescentar o componente D e agitar por 30 min. Acrescentar o componente C e agitar por 1 h. Guardar em seringas de 2 a 5 ml (uma porção) no freezer.

8.3 Anexo III

Solução de cloreto de cobalto

Solução de cloreto de cobalto 2,5 %

-0.25 g de CoCl_2

- 10ml de água destilada

Pesar o cobalto e misturar na água. A solução pode ser guardada por muito tempo.

Solução de sulfeto de amônio

- 5ml de ringer

- 5 gotas de sulfeto de amônio (20 % da solução em água) $(\text{NH}_4)_2\text{S}$

Pingar as gotas de sulfeto de amônio na solução de ringer. Se prepara no momento de usar.

Fixador AAF

- 80 ml de etanol 100%

- 12 ml de formaldeído 40%

- 8 ml de ácido acético glacial

Juntar todos os compostos. Pode guardar o preparado por muito tempo.

Solução reveladora base

- 100 ml de água destilada

- 10 g de glicose

- 0.17 g de hidroquinona

- 1.4 g de ácido cítrico

- 3 g de goma arábica.

Agitar bem. Ajustar para ph 2.5 - 2.6 com ácido cítrico. Pode armazenar alguns dias na geladeira.

Solução reveladora com prata

- 10 ml de solução reveladora base

- 1ml de AgNO_3 1 %

Misturar tudo. Se prepara no momento de usar.

Solução de Ringer para insetos (modificada por Case, 1957)

-1000ml de água destilada

- 7.5 g de NaCl

- 0.35 g de KCl

- 0.21 g de CaCl_2

- 0.14 g de NaHCO_3

- 2.5 g de glicose

Misturar tudo e ajustar a um pH de 7.0.

Tampão Sorensen:

A: Solução 0.15 Molar de KH_2PO_4

B: Solução 0.15 Molar de Na_2HPO_4

Tampão: misturar 19 volumes de A com 31 volumes de B.

A solução Ringer se prepara com: 10 volumes da solução base mais 1 volume do tampão.

8.4 Anexo IV

Soluções utilizadas na técnica de difusão de neurobiotina

1- Neurobiotina (Neurobiotin™ Tracer, Vector Laboratories, Burlingame, USA)

1% em solução de 0,25 M de KCl.

2- Oregon-green-Avidin

Solução estoque: 1mg de *oregon green avidin* em 1ml de Tampão Millonig's.

Diluir a solução estoque 1:40 e.g para cada 10ml do tampão Millonig's acrescentar 25 µl Triton X100, 0.1 g soro de proteína bovina (SAB). Então, colocar 0.5 ml desta solução e adicionar 12,5 µl de solução estoque de *Oregon-green-Avidin*; agitar fortemente.

Do Haematophagous Bugs Assess Skin Surface Temperature to Detect Blood Vessels?

Raquel A. Ferreira¹, Claudio R. Lazzari², Marcelo G. Lorenzo³, Marcos H. Pereira³

1 Laboratório de Insetos e Epidemiologia de Doenças de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Brazil, **2** Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 6035, Université François Rabelais, Tours, France, **3** Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Background: It is known that some blood-sucking insects have the ability to reach vessels under the host skin with their mouthparts to feed blood from inside them. However, the process by which they locate these vessels remains largely unknown. Less than 5% of the skin is occupied by blood vessels and thus, it is not likely that insects rely on a 'random search strategy', since it would increase the probability of being killed by their hosts. Indeed, heterogeneities along the skin surface might offer exploitable information for guiding insect's bites. **Methodology/Principal Findings:** We tested whether the bug *Rhodnius prolixus* can evaluate temperature discontinuities along the body surface in order to locate vessels before piercing the host skin. When placed over a rabbit ear, the bug's first bites were mostly directed towards the main vessels. When insects were confronted to artificial linear heat sources presenting a temperature gradient against the background, most bites were directly addressed to the warmer linear source, notwithstanding the temperature of both, the source and the background. Finally, tests performed using uni- and bilaterally antennectomized insects revealed that the bilateral integration of thermal inputs from both antennae is necessary for precisely directing bites. **Conclusions/Significance:** *R. prolixus* may be able to exploit the temperature differences observed over the skin surface to locate blood vessels. Bugs bite the warmest targets regardless of the target/background temperatures, suggesting that they do not bite choosing a preferred temperature, but select temperature discontinuities along the skin. This strategy seems to be an efficient one for finding blood vessels within a wide temperature range, allowing finding them on different hosts, as well as on different areas of the host body. Our study also adds new insight about the use of antennal thermal inputs by blood-sucking bugs.

Citation: Ferreira RA, Lazzari CR, Lorenzo MG, Pereira MH (2007) Do Haematophagous Bugs Assess Skin Surface Temperature to Detect Blood Vessels? PLoS ONE 2(9): e932. doi:10.1371/journal.pone.0009322

INTRODUCTION

Solenophagous insects such as mosquitoes, sucking lice and kissing bug need to pierce the skin of their hosts in order to reach the interior of blood-vessels with their mouthparts [1]. How do they perform this has not been analyzed in detail in any species, despite the relevance of vessel localization for successful haematophagy and even for parasite transmission.

Rhodnius prolixus, in addition of being a classical model for insect physiology studies, is a major vector of Chagas' disease, one of the main public health problems in Latin America [2-4]. Endemic to 21 countries, the disease affects approximately 16-18 million people, while other 120 million are exposed to risk of transmission [5]. In Venezuela, Colombia and some parts of Central America, *R. prolixus* Stål (1859) is the main vector of the disease [6].

The heat emitted by warm-blooded animals is the main cue used by haematophagous bugs to locate a host at short distances [7-9]. Indeed, heat is the only stimulus both, necessary and sufficient to trigger biting in these insects [10]. For the detection of heat sources, they use thermoreceptors mainly localized on their antennae [9-10]. These sense organs allow them to discriminate between heat sources of different temperature and determine their position in space [7-10]. When insects are in close proximity of a warm object, they extend their proboscis to reach the target and bite it. At that phase, bilateral inputs coming from both antennae are integrated to precisely locate the goal [9-10]. The role of heat as a cue for finding food by hematophagous bugs has been studied in relation to host location, but its role during biting remains relatively unknown. In this sense, there is one study [11] showing that bugs are able to bite cold surfaces and feed on blood kept at a temperature of just a few degrees Celsius, provided that their antennae are stimulated by heat. However, the role of heat in vessel location has not been investigated so far.

R. prolixus, a solenophagous bug, obtains food directly from vessels and arterioles [12]. After piercing the host skin, the insect moves the mouthparts under the epidermis until it reaches a blood vessel and penetrates it. This probing activity represents only 6% of the total contact time with the host during feeding [13]. It is a critical phase, because the insertion of the mouthparts and their movements under the skin cause tissue damage and the release of chemicals that can trigger nerve stimulation, hemostasis and inflammatory reactions [14]. Therefore, finding blood vessels quickly and without damaging the host by piercing its skin repetitively might have been a key feature for the adaptation of these bugs to haematophagy.

In the present investigation, we show that *R. prolixus* can locate a blood vessel before contacting the host skin with its proboscis. Moreover, we provide evidence supporting the role of the thermal sense and the antennae in guiding this behaviour.

Academic Editor: Ulfen Sieber, Freie Universität Berlin, Germany

Received November 21, 2006; Accepted September 3, 2007; Published September 26, 2007

Copyright: © 2007 Ferreira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding was provided by BRS/CIOR/2, FARE/MS, CAPES, CNPq and FAPESP/04746, CNRS and Université François Rabelais.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: marcelh@ppci.ufmg.br

RESULTS AND DISCUSSION

Targeting bites

When we confronted the bug with the ear of a rabbit, we observed that 77% (24/31) of their first bites (i.e., the very first contact of the proboscis of each insect with the skin) were oriented towards a major vessel or up to 2 mm away from it. We conclude that this distribution of bites indicates that these insects exploit sensory cues associated to blood vessels to detect them before contacting the host skin with their proboscis. Vessels revealed to be the warmest areas on the rabbit's ear, as the temperature over them was $32.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and gradually decreased to $31 \pm 0.5^\circ\text{C}$ up to 10 mm away.

Subsequently, we evaluated whether heat is used as a cue for vessel location by performing two experiments in which linearly-shaped heat sources were presented over lower temperature backgrounds, i.e., bugs were confronted to a heated wire presented over a metal plate that acted as background. Both the wire and the plate could have their temperature controlled independently.

In the first experimental series, we kept the linearly shaped source at 36°C over a background at 33°C . These assays revealed that bites were aimed either to the linear heat source or to its proximity (Figure 1), with a mean distance of 1.6 ± 0.6 mm between the spot contacted by the proboscis and the linear source. Control assays keeping the linear heat source at the same temperature as the background (i.e., 33°C), revealed a quite homogeneous distribution of bites, with mean distance of 3.4 ± 2.2 mm between the linear source and the spot contacted by the proboscis of bugs (Figure 1). This mean distance of the bites to the linear source resulted significantly larger than that observed in the first experimental series (Mann-Whitney, $p = 0.0003$).

Absolute vs. relative temperature

In the second experimental series, the linearly shaped heat source was kept at 39°C and the background at 36°C . Again, most bites were directed towards the linear heat source. Consistently, we did not observe such a pattern when the linear source was presented at the same temperature as the background (i.e., 36°C). The mean distance between the spot contacted by the proboscis and the

warmest linear heat source was 2.6 ± 1.1 mm. In the control assay that presented both, linear source and background at 36°C , a significantly larger distance of 6.6 ± 1.3 mm was observed (Mann-Whitney, $p = 0.0022$).

Previous work on tritatomies revealed that these insects prefer warm objects within a certain temperature range that can attract bugs and evoke proboscis extension [7–10]. Our findings go further, indicating that bugs do not select absolute temperatures when choosing a place to bite, but thermal contrasts between their targets and the background. This was revealed by the experiments in which insects were confronted with backgrounds at 33 or 36°C that presented 3°C warmer linear heat sources over them. Different hosts present diverse surface temperatures, e.g., a bird may have a higher body temperature than a mammal. Moreover, different parts of the body of a host have distinct surface temperatures. To respond to thermal differences and not to absolute temperatures would allow bugs to find vessels over a wide temperature range, because vessels are always warmer than the surrounding tissue.

On the other hand, our experiments revealed that insects were able to directly contact the warmer wire since the first bites (Figure 2b). Thus, insects should be able to locate the target even before touching the surface with their proboscis. Despite no meal was found by the insects, they did not resign, but continued biting the heat source. However, they alternated bites on the wire and at some distance at each side of the linear source showing an apparently zigzagging pattern of sequential bites (Fig. 2b). We suggest that the role of this biting pattern may be to increase the chance of contacting the real blood source by repetitive biting being performed uninterruptedly as far as an expected subsequent stimulus is not detected by their proboscis after physical contact, e.g., skin texture, skin chemistry or vessel properties like periodic vibrations.

The role of the antennae

In a third series of experiments, we tested the ability of uni- and bilaterally antennectomized insects to locate the linearly shaped heat source. Results have confirmed that, as it happens during the approach of the insect to a thermal source [9, 10], the bilateral integration of antennal inputs is needed to guide the insect's biting

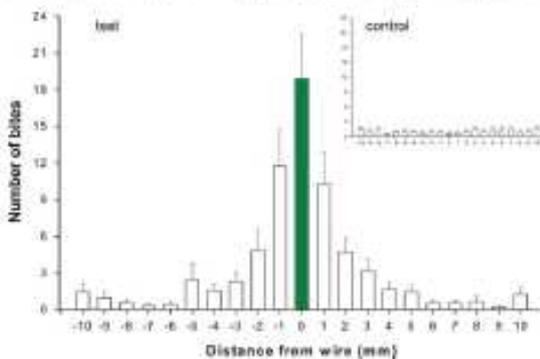


Figure 1. Mean distance of the sites of bites in relation to the position of the heated wire. Test: the wire was presented at 36°C and the background at 33°C . Control: both, the wire and the background were kept at 33°C . Each bar represents the mean value plus the standard error of the number of bites performed over the wire (green bar) and at different distances from it by 14 insects along a period of 10 min after the first bite occurred. doi:10.1371/journal.pone.0000932.g001

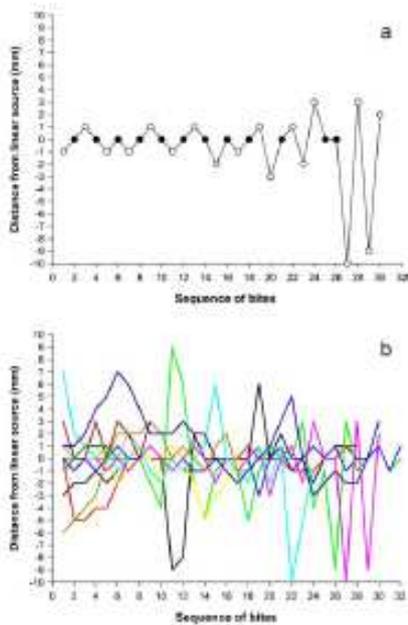


Figure 2. Sample records of the distance from an initial sequence of bites to the linear thermal source, performed by insects in an assay in which the linear source was 3°C warmer than the background. **a**, Sample record corresponding to a single insect; black circles represent direct contacts with the heated wire. **b**, The distribution of bites performed by several insects, showing the location of the spots contacted in consecutive biting attempts. Each sequence represents approximately one minute. doi:10.1371/journal.pone.0000932.g002

attempts (Figure 3). If one input is abolished by unilateral antennectomy, the insects miss the target, addressing their bites mostly to the zone located in the side of the remaining antenna. This result strongly supports that the thermal receptors located on the antennae are responsible for blood vessel detection. In addition, this experiment reveals that a thermo-tropotaxis mechanism is involved in guiding proboscis extension.

Different thermoreceptors than those known from the antenna would play a secondary role in guiding the proboscis. In fact, bilaterally antennectomized insects revealed to be unable to locate the heat source or even extend their proboscis [9,15]. This is quite surprising, because in other species of triatomines thermo-sensitive coeloconic sensilla are present on the antennae, but also on other regions of the body and, as a consequence, antennectomy does not abolish thermal sensitivity [15,16]. Three possible explanations can be proposed for the loss of the capacity to locate a warm source resulting from antennectomy. First, antennectomy can affect the normal behaviour in such a way that bugs stop responding to stimuli of certain modalities. Second, thermorecep-

tion can be present on the proboscis, but only antennal ones would guide biting. Finally, it can be a characteristic of *R. prolixus* to lack thermoreceptors other than those of the antennae, or at least not to have them on their proboscis. The first possibility is apparently supported by previous work that revealed that antennectomy deeply affects the normal behaviour of other bugs. They stop responding to warm objects by approaching them, and change to visually following moving objects or even extending their proboscis towards them [9]. Besides, even if they are still capable of synchronizing light or thermal environmental cycles, the expression of their daily activity cycles becomes altered [16]. Nevertheless, the lack of one antenna did not inhibit biting, since unilateral antennectomy induced the insects to perform the kind of systematic errors exactly expected from tropotactic integration of antennal inputs. This suggests that partial antennectomy does not inhibit thermodetection. The second option also seems less probable, since it is difficult to consider that the function of several thermoreceptors could be dissociated from biting and feeding. Regarding the third possibility, the existence of thermo-hygroscopic coeloconic sensilla on the proboscis of *R. prolixus* has been proposed, but not conclusively shown up to date [17,18]. To verify this, we searched for coeloconic sensilla using a scanning electron microscope (SEM) and no coeloconic thermo-hygroscopics could be observed on the proboscis of *R. prolixus*. Furthermore, as indicated above, triatomine bugs are able to feed on blood at 3°C, provided that their antennae are conveniently stimulated by heat [11]. In that case, if thermal receptors were present on the proboscis, the cold temperature of the blood source would have constituted an aversive stimulus, leading to inhibit feeding.

The fact that intact bugs managed to finely determine the location of thermal sources and that unilaterally antennectomized bugs failed to aim their proboscis in a biased manner suggests that proboscis sensors, if any exist, are not involved in mediating this task. It is relevant to state that the proboscis is mostly retracted under the head of the bugs, while the antennae are mostly positioned forward. After a heat source is located at very short distance [9–10], bugs extend their proboscis in order to bite. This also suggests that the proboscis is not involved in the detection of heat sources. We propose here that the thermal stimuli used for vessel and heat source location are exclusively detected by thermal sensors situated in bugs' antennae. Moreover, this information must be integrated bilaterally in order to trigger the precise responses observed in intact bugs.

Even when thermoreceptor may exist outside the antennae of *R. prolixus*, they may be associated to functions other than targeting a heat source. The presence of different types of thermoreceptor associated to different kinds of thermosensitivity has been previously reported in insects. In a temperature gradient, *Drosophila melanogaster* flies lose their normal preference for 24°C when antennectomized, but continue avoiding temperatures above 31°C [19]. Besides, it has been suggested for the same species that antennal low-temperature thermosensory mediate spatial orientation processes and high-temperature thermosensory located outside the antennae are associated with spatial memory [20]. Thermal nociception is another form of thermosensitivity, which in both larvae and adults of *D. melanogaster* depends on the expression of a single gene, *Junber* [21,22].

Searching for a vessel

An interesting aspect of the behaviour of triatomines confronted to thermal sources is that when an insect does not succeed to pierce the skin at a spot, it begins to bite on the proximity. This behaviour was first observed in *Triatona sylvana*, when stimulated by a warm metal plate associated to a container offering cold

Thermal sources

The thermal source was an aluminium plate (flat background) and a nickel-chrome wire (linearly shaped thermal source). The nickel-chrome wire (300 μm thickness) was fastened on the aluminium plate and both were thermostated at specific temperatures (accuracy: 1°C). In the first experimental series that used artificial thermal sources, the temperature of the wire and the background were 36° and 33°C, respectively. In the corresponding control series, both thermal sources were presented at 33°C. In the second experimental series, the temperature of the linear and the flat thermal sources were 39 and 36°C, respectively. In the control series for this experiment, both thermal sources were presented at 36°C.

Experimental arenas

Each insect was placed into a receptacle located in one end of an acrylic rectangular box (28 × 16 × 8 cm) and released after 10 minutes. A square opening (2 cm wide) located on the substrate of the box, 10 cm away from the receptacle and in a central position of the box, allowed the insect to contact either the rim of the rabbit's ear or the artificial thermal source. In the experiment presenting thermal sources to antennae-contacted insects, the arena was modified in order to allow the insects to reach the thermal source parallel to the heated wire. The new arena consisted of an acrylic corridor of 10 × 1 cm in which the heated wire was presented in a central position parallel to the arena's longitudinal axis. The new flat thermal source was identical to the previous one, but its area was diminished to 1 cm² in order to restrict the access of the bugs to a direction parallel to the wire. In this manner, the stimulus was presented to the insects aligned with their longitudinal axis and, therefore, it was possible for us to assign their initial bites to the wire, the left or the right half of the flat source, in order to check if the distribution pattern observed in the experiments with intact insects was maintained.

Data recording and analysis

A video camera sensitive to infrared (IR) light, was used to record their behaviour. The camera was mounted over the arena in

a zenithal position relative to the thermal source, and the scene illuminated by a panel of IR emitting LEDs (900 nm), whose light cannot be perceived by these insects [25].

The behaviour of the insects in the 2 × 2 cm window where the heat source was presented to them in the first experiment was videotaped and subsequently analysed. The biting activity of each bug was analysed during an interval of 10 min that was initiated after its first bite. In the second experiment, the analysis was carried out having the image of the 1 × 1 cm window projected on a TV screen. The location of the bites on this area was determined with 1 mm accuracy.

Statistics

To test the position of the bites performed by bugs on the linearly shaped heat source, we employed a quite conservative method. We measured the distance of each contact of the proboscis from the wire performed by each individual along 10 min and computed a mean distance per insect. These means were compared between test (temperature of the wire different from the background) and control (same temperature) groups. Provided that data did not meet normality assumptions, we used the Mann-Whitney test. It should be noted that after some unsuccessful attempts to obtain food, the insects started to bite in zigzag (Fig. 2) along the wire, and therefore, we certainly underestimated the precision of the insects. However, as long as this would make test and control data more similar and not enhance differences, we decided to tolerate this bias. Despite this, differences revealed as highly significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Flores and A. Kaufmann Zab for helpful comments on the manuscript and Mrs. C. Latorra for help with statistics. We also acknowledge the valuable comments from the reviewers MGL and CRB, wish to thank Prof. José Núñez for many fruitful and inspiring discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CL, ML, RF, MF. Performed the experiments: RF. Analyzed the data: CL, ML, RF, MF. Wrote the paper: CL, ML, RF, MF.

REFERENCES

1. Lethbridge M (2003) The biology of blood-sucking insects (2nd Edn) (Cambridge University Press: 336 p).
2. Chapas C (1995) Nova *Spinosoma* (Hemiptera: Reduviidae) a new genus and a new species of the subgenus *Spinosoma* from Argentina. *Revista de la Asociación Argentina de Entomología* 1: 159–165.
3. Lora R, Wignall J (1979) Revision of the Triatominae Reduviidae, Hemiptera and their significance as vectors of Chagas' disease. *Revista de la Asociación Argentina de Entomología* 1: 101–130.
4. Zlotnick R, Rabinovich R (1981) Chagas' disease and ecological approach with special emphasis on its insect vectors. *Anno Rev Entomol* 26: 101–133.
5. WHO (World Health Organization) (2001) Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease Buenos Aires, Argentina 13–30 April 2001. Available at: http://www.who.int/cd/dp/chagas/dp_chagas.pdf, accessed September 2006.
6. Scheffold C (1998) Triatominae, biología y control. United Kingdom: Eurosciences Publications.
7. Latorra G, Núñez JA (1996) Thermoregulation in relation to host and the duration of the temperature of contact in *Triatominae*. *J Insect Physiol* 35: 525–528.
8. Schmitt R, Torres RM, Sifuentes R, Rabinovich R (2000) The ability of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) to approach a thermal source solely by its infrared radiation. *J Insect Physiol* 46: 141–151.
9. Wignall J, Gillet JD (1974) The function of the antennae in *Blattella germanica* (Lepidoptera) and the mechanism of orientation to the host. *J Exp Biol* 11: 155–165.
10. Flores GB, Latorra CR (1994) The role of the antennae in *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) to approach a thermal source. *J Insect Physiol* 42: 433–440.
11. Latorra CR, Núñez JA (1999) Blood temperature and feeding behavior in *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae). *Entomol. Gener.* 11: 189–195.
12. Latorra CR, Sifuentes R, Torres RM (2005) Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. 5. The manner in which triatomine bugs obtain their blood meal, as observed in the stomach of the living rodent, with some remarks on the effect of the bite on human's clusters. *Ann Trop Med Parasit* 99: 222–225.
13. Guaraní AA, Delgado L, González NF, García AZ, Zúñiga MR (2005) Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatominae* on human hosts. *Ann Trop Med* 97: 321–330.
14. Ribeiro JM, Travesetto DM (2002) Role of anthropophilic behavior feeding site and parasitism properties. *Anno Rev Entomol* 48: 17–35.
15. Flores GB (2001) Las antenas y el sentido térmico de la estructura *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae). PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 143 p.
16. Latorra CR (1995) Olfaction organization of insecticide activity in the hemipterophagous *Triatominae* (Hemiptera). *J Insect Physiol* 33(11): 955–963.
17. Sifuentes R (1978) Study of the physiological and morphological characteristics of the antennae of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) and their role in the host-seeking process. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. 126 p.
18. Caste S (1990) Swells associated with the antennae of night species of *Triatominae*. *J Morphol* 225: 185–201.
19. Sifuentes R, Torres R (1996) Behavioral genetics of thermoregulation and locomotion in *Triatominae*. *Physiol Zool* 69: 670–684.
20. Zan T (2004) The *Triatominae* in *Drosophila* have different behavioral kinetics. *J Comp Physiol A* 191: 255–261.
21. Torres R, Wilson RL, Latorra CR, Sifuentes R (2000) *Triatominae*, a *Drosophila* gene essential for recognition. *Cell* 113: 319–321.

22. Xu SF, Cuiq CL, Li XZ, Peng WQ, Ye YZ, et al. (2006) Thermal neovascularization in adult Drosophila: behavioral characteristics and the role of the pattern gene. *Genes Brain and Behavior* 5: 605-615.

23. Robinson CE, Isenst TC, Lenzel CR. (2003) Light-induced and circadian changes in the temporal eye of the honeybee genus *Trigona* sp. *Journal of Insect Physiology* 49(6): 501-8.

9 Referências bibliográficas

Altman JS & Tyrer NM 1977. The locust wing hinge stretch receptors II. Variation, alternative pathways and "mistakes" in the central arborizations. *J. Comp Neuro.* 1172 (3):431-9.

Amino R, Porto RM, Chammas R, Egami MI & Schenkman S 1998. Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. *J. Biol. Chem*, 273 (38): 24575-24582.

Ampleford EJ & Steel CGH 1982. Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol. A* 147: 281-286.

Bacon JP & Altman JS 1977. A silver intensification method for cobalt-filled neurons in wholemount preparations. *B. Res* 138: 359-363.

Bar-Zeev M, Maibach HI & Khan AA 1977. Studies on the attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to man. *J Med Entomol* 12:113-120.

Barrozo RB 2003. Orientación al hospedador em la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae): claves sensoriales responsables. *Thesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas*, Universidad 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, Minoli SA & Lazzari CR 2004a. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *J. Insec. Physiol*, 50, 249-254.

Barrozo RB & Lazzari CR 2004b. Orientation behaviour of the 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 & Lazzari CR 2006. Orientation response of haematophagous bugs to CO₂: the effect of the temporal structure of the stimulus. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 192(8):827-31.

Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR, Insausti T, Minoli SA, Fresquet N, Rospars JP & Anton S 2009. Antennal pathways in the central nervous system of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Arthropod Struct Dev*. MAR 38(2):101-10.

Barth R 1952. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae. II um novo órgão sensível dos Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 5,1-4.

Barth R 1953. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). III pesquisas sobre o mecanismo de picada das Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 51,11-33.

Belkaid Y, Valenzuela JG, Kamhawi S, Rowton E, Sacks DL & Ribeiro JMC 2000. Delayed- type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by fly? *PNAS*, 97, n° 12, 6704-6079.

Bérenger JM & Blanchet D 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(6): 733-736.

Bernard J, Pinet JM & Boistel J 1970. Électrophysiologie des récepteurs des stylets maxillaires de *Triatoma infestans* action de la température et de la teneur en eau de l'air. *J. Insect. Physiol*, 16, 2157-2180.

Bernard J 1974. Étude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un Hemiptère: *Triatoma*

infestans. These pour obtenir Le grade de Docteur ès- Sciences Naturelles, Université de Rennes, Rennes, França.

Blum MS 1985. *Fundamentals of insect physiology*. New York, Chishester, Brisbane, Toronto, Singapore. John Wiley & Sons, Inc.

Bo. Site: <http://www.ocbrasil.com.br/artigos/peltier.htm>. Acessado em 02/12/2008.

Bodin A, Barrozo RB, Couton L & Lazzari CR (2008). Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. 54:1343-1348.

Bosch, OJ; Geier M & Boeckhj 2000. Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chem. Senses*, 25 323-330.

Braks MA, Meijerink J & Takken W 2001. The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L- lactic acid, in an olfactometer. *Physiol. Entomol*, 26, 142-148.

Brown AWA 1951. Studies of the response of the female *Aedes* mosquito. Part IV. Field experiments on Canadian species. *Bull. Entomol Res.* 42,575-583.

Burssel E, Gough AJE, Beevor PS, Cork A, Hall DR & Vale GA 1988. Identification of components of cattle urine attractive to tsetse flies, *Glossina spp.* (Diptera: Glossinidae). *Bull. Entomol. Res*, 78, 281-291.

Carbajal de la Fuente AL & Catalá S, 2002. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. *Mem. Inst. Osw. Cruz*. 97, 1121- 1125.

Case R 1957. Differential of the effect of pH and CO₂ on the spiracular function of insect. *J Cell Comp Physiol*, 49,103-113.

Catalá S & Schofield CJ 1994. Antennal sensilla of *Rhodnius*. *J. Morphol.* 219, 193-203.

Catalá S 1996. Sensilla associated with the rostrum of eight species of Triatominae. *J. Morphol*, 228, 195-201.

Catalá S 1997. Antennal sensilla of triatominae (Hemiptera, Reduviidae): a comparative study of five genera. *Int. J. Insect Morphol & Embryol.* 26, 2 67-73.

Chaïka Slu 1980. Ultrastructure of the antennal sensillae of the bug, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Parazitologia.* 14(6):486-92.

Chagas C 1911. Moléstia de Carlos Chagas ou thyreoidite parasitaria (Nova doença humana transmitida pelo barbeiro *Conorhinus megistus*). *Academia Nacional de Medicina*, 3.

Chapman RF 1982. Chemoreception: The significance of receptor numbers. *Adv. Insect.Physiol*, 16: 247-336.

Chapman RF 1998. *The insects structure and fuction.4th.* New York: Cambridge University Press.

Chapman RF 2002. Development of phenotypic differences in sensillum populations on the antennae of a grasshopper, *Schistocerca americana*. *J Morphol.* 2002 254(2):186-94.

Cohen MJ, Pitman RM & Tweedle CD 1973. Cobalt staining used for demonstrating neuronal branching. *J Physiol.* 232(2):58-59.

- Constantinou C 1984. Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma phyllossoma*, *T. infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Interdisc. cycle res.* 15: 203-212.
- Costa J, Argolo AM & Felix M. 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, 1385: 47-52.
- Costa J & Felix M. 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(1): 87-90.
- Dan A, Pereira MH, Pesquero JL, Doitaiuti L & Beirão OS 1999. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J. Med. Entomol*, 36, n.6, 875-879.
- Dekker T, Steib B, Cardé RT & Geier M 2002. L-lactic acid: a human-signifying host cue for the antropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol*, 16, 91-98.
- De Jong R & Knols BGJ 1995. Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species. *Experientia*, 51, 80-84.
- De Jong R & Knols BGJ 1995. Olfactory responses of host-seeking *Anopheles gambiae* s.s. Giles (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* 59(4):333-5.
- De Jong R & Knols BGJ 1996. Limburger cheese as na attractant for the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Parasitol. Today* 12, 159-161.
- Dias JCP 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol. Today*, 3, 336-341.

Edgecomb RS & Murdock LL 1992. Central projections of axons from taste hairs on the labellum and tarsi of the blowfly, *Phormia regina* Meigen. *J Comp Neurol*. 22;315(4):431-44.

Eiras AE & Jepson PC 1991. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bull. Entom. Res*, 81, 151-160.

Espínola HN 1973. Aspectos do Comportamento do *Triatoma infestans* (Klug, 1834) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Brasil.

Ferreira RA 2004. Aspectos relacionados à escolha do sítio de alimentação em *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Heteroptera: Reduviidae) e o papel do sentido térmico neste comportamento. *Dissertação para obter o título de mestre em Ciências Biológicas*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Ferreira RA., Lazzari., CR., Lorenzo MG., Pereira., MH 2007. Do Haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? PLoS ONE. Published online. September 26. 2(9): e932.

Flores GB 2001. Las antenas y el sentido térmico de la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Thesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas*, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Flores GB & Lazzari CR 1993. Bilateral integration of antennal inputs during thermal orientation in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* 88,250.

Flores GB & Lazzari CR 1996. The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. *J. Insect. Physiol*, 42, 433-440.

Flores GB 2005. In the heat of the night. An assassin bug's sensory journey. *Natural History*. July/ August 32-37.

Forero D, Weirauch C & Baena M. 2004. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670: 1-12.

Friend WG & Smith JJB 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J. Insect. Physiol*, 17, 233-243.

Friend WG & Smith JJB 1977. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Ann. Rev. Entomol*, 22, 309-331.

Galvão C, Carcavallo 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.

Gamboa CJ 1963. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliado em Venezuela. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 54, 18-25.

Geier M, Sass HS & Boeckh J 1996. A search for components in human body odour that attract females of *Aedes Aegypti*. En *Mosquito olfaction and olfactory-mediated Mosquito-host interactions* (eds. G. Cardew, J. Goode), pp 132-148. Ciba Foundation Symposium 200. John Wiley & Sons Ltd, New York.

Geier M, Bosch OJ & Boeck J. 1999a. Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. *The J. Exp. Biol*, 202, 1639- 1648.

Ghaninia M, Ignell R & Hansson BS 2007. Functional classification and central nervous projections of olfactory receptor neurons housed in antennal trichoid sensilla of female yellow fever mosquitoes, *Aedes aegypti*. *Eur J Neurosci*. 226(6):1611-23.

Groenendijk CA & Takken, W 1996. Host odour composition affects host location efficiency of tsetse (Diptera, Glossinidae). *Physiol. Entomol*, 21,203-211.

Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF & Pereira MH. 2000. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J Insect Physiol*, 1;46(7):1121-1127.

Guerenstein PG & Guerin PM 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *T. J. Exp. Biol*, 204, 585-597.

Guerenstein PG & Lazzari CR 2008. Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Tropica* doi: 10.1016/j.actatropica.2008.09.019.

Heger TJ, Guerin PM & Eugster W 2006. Microclimatic factors influencing refugium suitability for *Rhodnius prolixus*. *Physiol Entomol* 31: 248-256.

Hellmann K & Hawkins RI 1964. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature* 201, 1008- 1009.

Hellmann K & Hawkins RI 1965. Prolixin-S and Prolixin-G: two anticoagulant from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature* 207, 265-267.

Hohenssee S, Bleiss W, Duch C 2008. Correlative electron and confocal microscopy assessment of synapse localization in the central nervous system of an insect. *J Neurosci Methods*. 15;168(1):64-70.

Ignell R, Anton S & Hansson BS 2000. The maxillary palp sensory pathway of Orthoptera. *Arth Struct Devel*, 29, 295-305.

Ignell R & Hansson BS 2005. Projection patterns of gustatory neurons in the suboesophageal ganglion and tritocerebrum of mosquitoes. *J Comp Neurol*. 14;492(2):214-33.

Inoshita T & Tanimura T 2006. Cellular identification of water gustatory receptor neurons and their central projection pattern in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24;103(4):1094-9.

Insausti TC 1994. Nervous System of *Triatoma infestans*. *J Morphol*. 221, 343-359.

Insausti TC & Lazzari CR 1996. Central projections of first- order ocellar interneurons in the bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *J. Morphol*. 229: 161-169.

Insausti TC & Lazzari CR. 2000. The postembryonic development of the ocellar system of *Triatoma infestans* Klug (Heteroptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95(6):877-81

Ismail IAH & Hammoud, E I 1968. The use of coeloconic sensilla on the female antennae in differentiating the members of the *Anopheles gambiae* Giles complex. *Bull WHO*, 38: 814-821.

Jorgensen K, Kvelo P, Almaas TJ & Mustaparta H 2006. Two closely located areas in the suboesophageal ganglion and the antennae and the proboscis in the moth *Heliothis virescens*. *T. J. Comp. Neurol* 496, 121-134.

Kaissling KE 1987. *R.H. Wright lectures on insect olfaction*. Munich: Konrad Colbow. s/p.

Kalvachova P, Hribalova V, Kodym P & Volf P 1999. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol*, 36, n.3, 341-344.

Kent KS & Hildebrand JG 1987. Cephalic sensory pathways in the central nervous system of larval *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 27;315 (1168):1-36.

Knols BG, de Jong R & Takken W 1994. Trapping system for testing olfactory responses of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in a wind tunnel. *Med Vet Entomol*. 8(4):386-8.

Knols BGJ 1996. Odour-mediated host-seeking behaviour of the Afro-tropical malaria vector *Anopheles gambiae* Giles, *Doctored of the thesis* 1-213.

Knols BGJ; Van Loon JJA; Cork A; Robinson RD.; Adam W.; Meijerink J; DE Jon R; Takken W 1997. Behavioural and electrophysiological responses of the female malaria mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to Limburger cheese volatiles. *Bull Entomol Res*, 87 (2), 151-159.

Krishnan B, Dryer SE & Hardin PE 1999. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400, 375- 378.

Lavoipierre MMJ, Dickerson G & Gordon RM 1959. Studies on the methods of feeding of blood sucking arthropods: I- The manner in which triatomine bugs

obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effect of the bite on human volunteers. *Ann. Trop. Med. Parasitolol*, 53, 235-252.

Lazzari CR & Núñez J 1988. Blood temperature and feeding behaviour in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Entomol. Gener*, 14(3/4) 183-188.

Lazzari CR & Núñez JA 1989. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distance sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect. Physiol*, 35, 525-529.

Lazzari CR 1990. Fisiología del comportamiento de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera : Reduviidae). Orientación térmica. *Thesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas*, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 161.

Lazzari CR 1991. Temperature preference in *Triatoma infestans*. *Bull. Entomol. Res.* 81:273-276.

Lazzari 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect. Physiol*, 38: 895-903.

.Lazzari CR & Wicklein M 1994. The cave-like sense organ in the antennae of triatomine bugs. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 89(4), 643-648.

Lehane MJ 1991. *Biology of Blood-sucking insects*. London: Harper Collins Academic, 287.

Lent H & Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) and their significance as vector of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist*, 163, 125-520.

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). *Act. Trop*, 70, 163-170.

Lorenzo MG, Manrique G, Pires HH, de Brito Sanches MG, Diotaiuti L & Lazzari CR 1999. Yeast culture volatiles as attractants for *Rhodnius prolixus*: electroantennogram responses and captures in yeast-baited traps. *Act. Trop*, 15;72 (1), 119-124.

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.

Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B & Vidaurre P. 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo*, 3(1): 1-11.

Mciver SB 1982. Sensilla of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol*, 19: 489-535.

Millong G 1961. A modified procedure for lead staining of thin sections. *J Biophys Biochem Cytol*. 11:736-9.

Minoli SA & Lazzari CR 2003. Chronobiological basis of thermopreference in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect. Physiol* 49: 927-932.

Mitchell BK & Itagaki H 1992. Interneurons of the subesophageal ganglion of *Sarcophaga bullata* responding to gustatory and mechanosensory stimuli. *J Comp Physiol A*. 171(2):213-30.

Mitchell BK, Itagaki H & Rivet MP 1999. Peripheral and central structure involved in insect gestation. *Microsc Res Tech* 47: 401-415.

Mobbs P G 1985. Brain structure. En: *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* vol 5. Nervous system: Structure and motor function. (Eds) G. A. Kerkut & L. I. Gilbert, pags. 300- 370. Pergamon Press, Oxford.

Núñez J 1982. Food source orientation an activity in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. Ent. Res*, 72, 252-262.

Núñez JA 1987. Behaviour of Triatominae bugs. In *Chagas' Disease Vectors* (Edited by Brenner and Stoka), Crc Press., II, 1-29, Fla.

Núñez JA &Lazzari CR 1990. Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Heteroptera, Reduviidae) in the absence of a live host. I some factors affecting the artificial feeding. *J Appl Entomol*. 109, 87-92.

Okada J &Toh Y 2000. The role of antennal hair plates in object guided tactile orientation of the cockroach (*Periplaneta americana*). *J. Comp. Physiol A* 186, 849-857.

Page TL & Koelling E 2003. Circadian rhythm in olfactory response in the antennae controlled by the optic lobe in the cockroach. *J. Insect. Phisiol*. 49, 697-707.

Pereira MH, Souza MEL, Vargas AP, Penido CM, Martino MS & Diotauti L 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Tropica* 61, 255-261.

Pinet JM 1970. Recherches sur les stylets mandibulaires et maxillaires de *Rhodnius prolixus* Stal (Heteroptera Reduviidae). Thèse Doct. Sci. Nat. Paris.

Pinet JM & Bernard J 1972. Essai d'interprétation de l'ode d'action de la vapeur d'eau et de la température sur un récepteur d'insecte. *Ann. Zool.-Écol. Anim*, 4, 483-495.

Pitman RM, Tweedle CD & Cohen MJ. 1972. Branching of central neurons: intracellular cobalt injection for light and electron microscopy. *Scien.* 28176 (33):412-4.

Rajashekhar K & Singh R 1994. Neuroarchitecture of the tritocerebrum of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 349, 633-45.

Rehder V. 1989. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *J Comp Neurol.* 15, 279(3):499-513.

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, Insausti TC & Lazzari CR 2002. Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Exp Biol*, 205(Pt 2):201-10.

Ribeiro JMC & Garcia ES 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 26, 303-307.

Ribeiro JMC 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Rev. Entomol*, 32, 463-478.

Ribeiro JMC, Marinotti O & Gonzales R 1990. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Brit J Pharmacol*. 101, 932-936.

Ribeiro JMC, Hazzard JMH, Nussenzvig RH, Champagne DE & Walker FA 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a blood-sucking insect. *Scien* 260, 539-541.

Ribeiro JMC & Walker FA 1994. High affinity histamine-binding and anti-histaminic activity of the salivary NO-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Med*, 180, 2251-2257.

Ribeiro JMC 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Diseases*, 4, n.3, 143-152.

Ribeiro JMC & Franscichetti IM 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Ann. Rev. Entomol* 48, 73-88.

Ribi WA 1987. Biological Electron Microscopy. A Handbook in Biological Electron Microscopy. Germany: Max-Planck-Institut und Universität Tübingen. 106 p.

Roeder KD 1998. *Nerve cells and insect behavior*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, Inglaterra.

Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, & Galvão C. 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *Zootaxa* 1443: 55–64.

Schmitz,H, Trenner S, Hofmann MH & Bleckmann H 2000. The ability of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae) to approach a thermal source solely by its infrared radiation. *J. Insect. Physiol.* 46, 745-751.

Schofield CJ 1994. Triatominae, biología y control. United Kingdom: *Eurocommunica Publications*, 79p.

Schofield CJ, 1988. Biosystematics of Triatominae. In *MW Service, Biosystematics of Haematophagous Insects*. Clarendon Press, Oxford.

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

Schröter U & Menzel R 2003. A new ascending sensory tract to the calyces of the honeybee mushroom body, the subesophageal-calycal tract. *J Comp Neurol.* 13;465 (2):168-78.

Settembrini BP 1984. Circadian rhythms of locomotor activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* (21) 2: 204-212.

Singh RN & Nayak SV 1985. Fine structure and primary sensory projections of sensilla on the maxillary palp of *Drosophila melanogaster* meigen (Diptera: Drosophilidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 14: 291- 306.

Smallegange RC, Qiu YT, van Loon JJ & Takken W 2005. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chem Senses*, 30(2):145-52.

Steib B, Geier M & Boeckh J 2001. The effect of lactic acid on odour- related host preference of yellow fever mosquito. *Chem. Sens*, 26, 523-528.

Soares AC, Tavares JC, Gontijo NF, Santos VC, Teixeira MM & Pereira MH 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae, Triatominae) in mouse skin. *J. Insect. Physiol.* 52, 468-472.

Takken W & Kline DL 1989. Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. *J. Am. Mosq Cont Ass.* 5, 311-316.

Takken W & Knols BG 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 44:131-57.

Taneja J & Guerin P.M 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.

Torr SJ & Mangwiro TNC 1996. Upwind flight of tsetse (*Glossina spp.*) in response to natural and synthetic host odour in the field. *Physiol. Entomol.* 21, 143-150.

Tyrer NM & Altman JS 1974. Motor and sensory flight neurones in a locust demonstrated using cobalt chloride. *J Comp Neurol.* 15, 157(2):117-38.

Vale GA, Hail DR & Gough AJE 1988. The olfactory responses of tsetse flies, *Glossina spp.* (Diptera, Glossinidae), to phenols and urine in the field. *Bull. Entomol. Res.* 78, 293-300.

Van Essen PHA, Kemme JA, Ritchie SA & Kay BH 1994. Differential responses of *Aedes* and *Culex* mosquitoes to octenol or light in combination with carbon dioxide

in Queensland, Australia. *Med Vet Entomol* 8, 63-67.

WHO (World Health Organisation), 2005. UNDP/ World Bank/ WHO special programme for research and training in tropical diseases. World Health Organisation, Geneva.

Wigglesworth, V.B., 1931. The physiology of excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus*. I. Composition of the urine. *J. Exp. Biol.* 8, 411-427.

Wigglesworth VB & Gillett JD 1934. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. *J. exp. Biology*, 11, 120-139.

Wiesinger D 1956. Die beudeutung der Umweltfktoren fur den sugakt von *Triatoma infenstans*. *Act Trop.* 13, 97-141.

Zeledon R & Rabilnovick JE 1981. Chagas's disease: and ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *A. Rev. Ent*, 26, 101-133.