

Análise morfológica de ovos de *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) por microscopia eletrônica de varredura

Morphological analysis of the eggs of *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) by scanning electron microscopy

Valdir Dias Lamas Jr.¹, Solange Ribeiro Peixoto¹, Helene Santos Barbosa², Hugo Lopes Guimarães¹, José Jurberg¹

¹ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

² Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Estrutural, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

OBJETIVO: Ampliar o conhecimento da morfologia dos ovos de *Triatoma pintodiasi*, pelas técnicas de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura (MEV), possibilitando a visualização de aspectos que servirão de parâmetros para a caracterização e a identificação dessa espécie. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Para a microscopia óptica, selecionaram-se 12 ovos, logo após a postura, observados através da lupa estereoscópica para visualização das estruturas e aferição das medidas. Para a morfometria, utilizou-se a escala em lâmina micrométrica e, posteriormente, analisada por um software, visando obtenção de média e desvio padrão. Para a seleção das áreas e observações de suas estruturas, selecionaram-se 10 ovos, que foram preparados, metalizados com ouro e levados à MEV. O corpo do ovo foi dividido em três áreas, com a contagem de perfurações em três células de cada área, visando minimizar a fração de erros de contagem e da mensuração de estruturas. **RESULTADOS:** Os ovos mediam, em média, 1,51 mm de comprimento e 0,89 mm de largura, corpo com exocório no primeiro terço da extensão do ovo apresentando células poligonais, variando entre pentagonais e hexagonais. As células do corpo apresentaram perfurações esparsas, variando entre 21–35 orifícios em cada célula. Opérculo levemente proeminente formado por células poligonais abauladas. **CONCLUSÃO:** A análise dos ovos revelou que *T. pintodiasi* mostra similaridades estruturais com *Triatoma circummaculata*, porém a configuração do primeiro terço do exocório é uma característica representativa importante e pode servir de base para estudos mais aprofundados sobre essas espécies.

Palavras-chave: Reduviidae; Triatominae; Doença de Chagas.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To increase the knowledge of the morphology of the eggs of *Triatoma pintodiasi* by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), allowing the visualization of characteristics that can be patterns for characterization and identification of this species. **MATERIALS AND METHODS:** For the optical microscopy, 12 eggs were selected shortly after to be laid, and observed through the stereoscopic magnifying glass for viewing the anatomical structures and the assessment of measurements. For the morphometry, the micrometric scale was used, and later analyzed by a software for medium leakage and standard deviation. For the selection of the areas and observations of their structures, 10 eggs were selected, prepared, metalized with gold and analyzed by SEM. The egg body was divided into three areas, with the counting of perforations in three cells of each area, aiming to minimize the fraction of errors of counting and measurement of structures. **RESULTS:** The median values for the eggs were 1.51 mm in length and 0.89 mm in width, body with exocory in the first third of the extension of the egg presenting polygonal cells, varying pentagonal and hexagonal. Body cells showed sparse perforations ranging from 21 to 35 holes in each cell. Lightly prominent opérculo formed by bulged polygonal cells. **CONCLUSION:** The analysis showed structural similarities between *T. pintodiasi* and *Triatoma circummaculata*, but the configuration of the first third of the exochorium is an important feature and can be the basis for further studies on these species.

Keywords: Reduviidae; Triatominae; Chagas Disease.

Correspondência / Correspondence:

Valdir Dias Lamas Jr.

Av. Brasil, 4365. Pavilhão Rocha Lima, 5º andar. Bairro: Manguinhos. CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: lamas@ioc.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

Triatoma pintodiasi Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) é uma espécie críptica do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* que apresenta grande semelhança morfológica com a *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859). Suas principais diferenças, em relação à *T. circummaculata* e à *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, estão na pigmentação do lobo posterior do pronoto, na morfologia da genitália do macho, nas proporções morfométricas da cabeça e na dosagem de proteínas presentes na hemolinfa¹. Essas três espécies neotropicais são simpátricas, podendo ser encontradas vivendo em rochedos e pedregais no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo raramente observadas no intra e peridomicílio, e, até o momento, somente a *T. circummaculata* foi encontrada naturalmente infectada pelo *Trypanosoma cruzi*^{1,2}.

No processo de identificação e classificação desses vetores da doença de Chagas, o conhecimento taxonômico adequado é fundamental para a delimitação interespecífica das espécies. Devido ao processo de especiação contínuo, existem dificuldades ou até impedimentos para a delimitação de determinados táxons^{3,4}, e, por isso, algumas ferramentas vêm sendo incorporadas à taxonomia morfológica clássica, a fim de auxiliar na identificação de caracteres que servirão como parâmetros para a delimitação correta de uma espécie. Dentre as abordagens, pode-se citar o estudo comparativo da morfologia das genitálias dos machos e as técnicas bioquímicas, moleculares e estatísticas^{1,5,6,7}. Nesse contexto, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) tornou-se uma grande aliada da taxonomia no estudo da Triatominae devido a sua eficácia, demonstrando excelentes resultados por meio da análise estrutural de uma superfície, atribuindo-lhe maior resolução, possibilitando observar estruturas que não são vistas à microscopia óptica e, assim, auxiliando para a descrição de novas espécies e estudos taxonômicos^{8,9,10,11,12}.

Uma análise morfológica comparativa, elaborada por Barata¹³, detalhou as características macroscópicas e exocoriais de 10 espécies do gênero *Rhodnius* Stål, 1859, observadas por meio da técnica de MEV, possibilitando a organização de uma chave para as mesmas. Os resultados de tal estudo corroboraram as teses de Pinto¹⁴ e de Galliard¹⁵, dentre os primeiros a estabelecerem que a ornamentação do exocório dos ovos de triatomíneos poderia ser usada na identificação de algumas espécies.

Com o objetivo de ampliar o conhecimento e a caracterização da espécie *T. pintodiasi*, a morfologia dos ovos foi descrita, utilizando-se as técnicas de microscopia óptica e de MEV, incluindo a caracterização do seu perfil morfométrico e a comparação da sua configuração exocorial com a *T. circummaculata*.

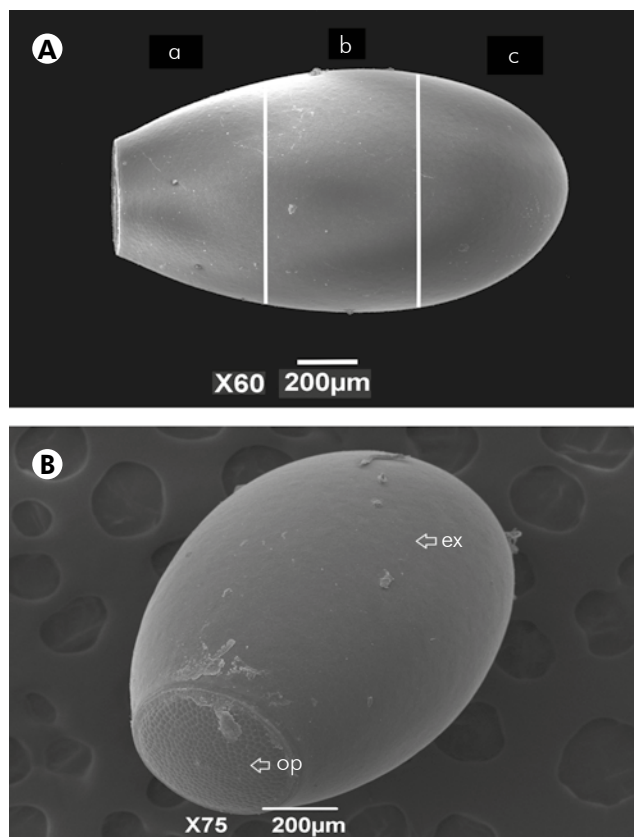
MATERIAIS E MÉTODOS

Cinco machos e sete fêmeas foram separados para a formação de colônia e consequente obtenção

de ovos. Esses espécimes eram oriundos de colônias do insetário existente no Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e eram provenientes de coletas no Rio Grande do Sul, na localidade do Rincão dos Ventura, na cidade de Santa Maria. As colônias foram mantidas em cristalizadores de vidro, com suporte de madeira e papel filtro em seu interior para aumentar a superfície de contato e diminuir a umidade. A temperatura e umidade foram registradas duas vezes ao dia (manhã e tarde).

Para a microscopia óptica, foram selecionados 12 ovos logo após a postura, que foram observados através da lupa estereoscópica ZEISS STEMI SV 11, para visualização das estruturas e aferição das medidas. Para morfometria, foi utilizada escala em lâmina micrométrica, posteriormente processada no software Microsoft Office Excel 2007 para obtenção de média e desvio padrão (DP). Para a análise estrutural, foram selecionados 10 ovos limpos, fixados em fita dupla face em *stubs* metálicos, posteriormente metalizados com ouro e levados ao MEV modelo JEOL JSM – 6390LV, para seleção das áreas e observações de suas estruturas. Com o intuito de minimizar a fração de erros na contagem e na mensuração das estruturas, o corpo do ovo foi dividido em três áreas (Figura 1A) com contagem das perfurações em três células de cada área.

Todo o material citado nos resultados encontra-se depositado na Coleção Herman Lent (IOC/Fiocruz).



A: Divisão do exocório – (a) primeiro terço, (b) segundo terço, (c) terço final; **B:** Visão geral do ovo – (ex) exocório, (op) opérculo.

Figura 1 – Corpo do ovo do *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013

RESULTADOS

MICROSCOPIA ÓPTICA

Os ovos apresentaram estrutura simétrica e ausência de "colo" e "colarinho". Denotaram coloração levemente alaranjada após a postura, alterando-se de acordo com a maturação do embrião, transpassando à pigmentação levemente avermelhada. Mediram, em média, 1,51 mm (DP = 0,03) de comprimento e 0,89 mm (DP = 0,02) de largura (Tabela 1), apresentando 25% de incidência de chanfradura lateral (achatamento lateral).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Corpo com exocório (Figura 1B) no primeiro terço da extensão do ovo, apresentando células poligonais, com variação de pentagonais a hexagonais. Essas apareceram, em maioria, pouco delimitadas quando próximas da borda (Figura 2) e com ausência de colo. No segundo terço do ovo, a arquitetura exocorial dispunha de células pentagonais e hexagonais (Figura 3A). As células do corpo apresentaram

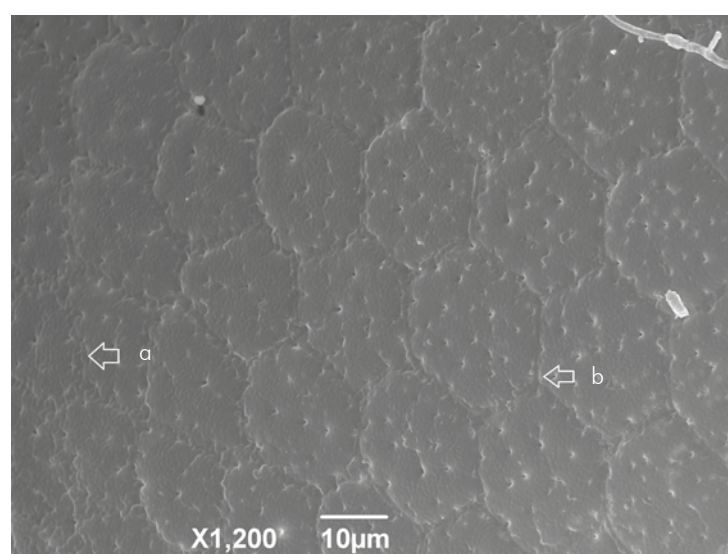
perfurações esparsas, variando entre 21–35 orifícios em cada célula (Figura 3B). Opérculo (Figura 1B) do tipo verdadeiro, levemente proeminente, formado por células poligonais abauladas (Figura 4A), em sua maioria hexagonais, apresentando perfurações distribuídas em todas as células e linhas limitantes bem aparentes com aspecto de sulco (Figura 4A). Opérculo apenso à borda do ovo, com evidente fenda na junção (Figura 4B). Borda com formato regular em toda sua extensão (Figura 5B), presença de aerópilas (Figura 5A) e micrópilas (Figura 5B) em todo seu contorno.

Comparando as características obtidas por meio da MEV dos ovos de *T. pintodiasi* com as discriminadas por Rosa et al.¹⁶ e Cardozo-de-Almeida et al.¹¹ para *T. circummaculata*, foi possível destacar as similaridades encontradas na configuração exocorial das células do opérculo, juntamente com as do corpo do ovo, realçando a inespecificidade na quantidade das perfurações presentes nas células, ressaltando que esta é a primeira descrição morfológica pelo uso de MEV e morfométrica para ovos de *T. pintodiasi*.

Tabela 1 – Comparações entre os ovos de *T. pintodiasi* com os de *T. circummaculata* (descrito por Cardozo-de-Almeida et al.¹¹ e Rosa et al.¹⁶), evidenciando a similaridade das estruturas exocoriais

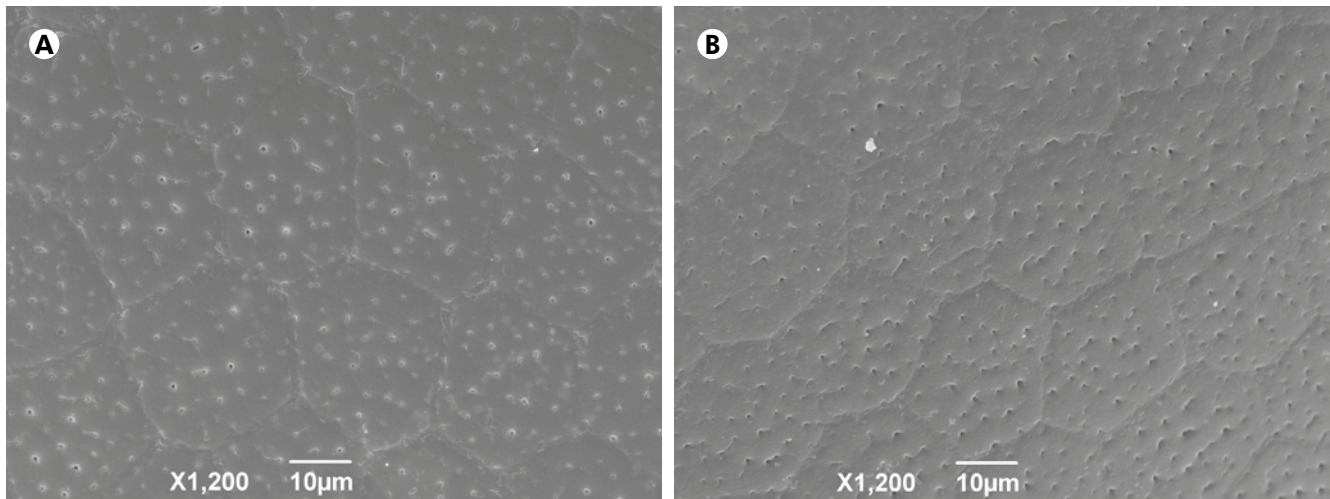
Espécie	Comprimento/Largura	Perfurações por células	Formato das células	Células do opérculo/ Formato do opérculo
<i>T. pintodiasi</i>	1,51/0,89 mm	21–35	Poligonais; existência de algumas pentagonais, com maioria hexagonais	Abauladas, levemente proeminente
<i>T. circummaculata</i> (Cardozo-de-Almeida et al. ¹¹)	1,47/0,87 mm	35	Hexagonais	Abauladas, levemente proeminente
<i>T. circummaculata</i> (Rosa et al. ¹⁶)	1,55/0,90 mm	Numerosas	Poligonais; existência de algumas pentagonais, com maioria hexagonais	Superfície estofada, circular convexa

A morfometria dos ovos foi apresentada de forma elucidativa, devido à diferença de softwares empregados nos estudos supracitados.



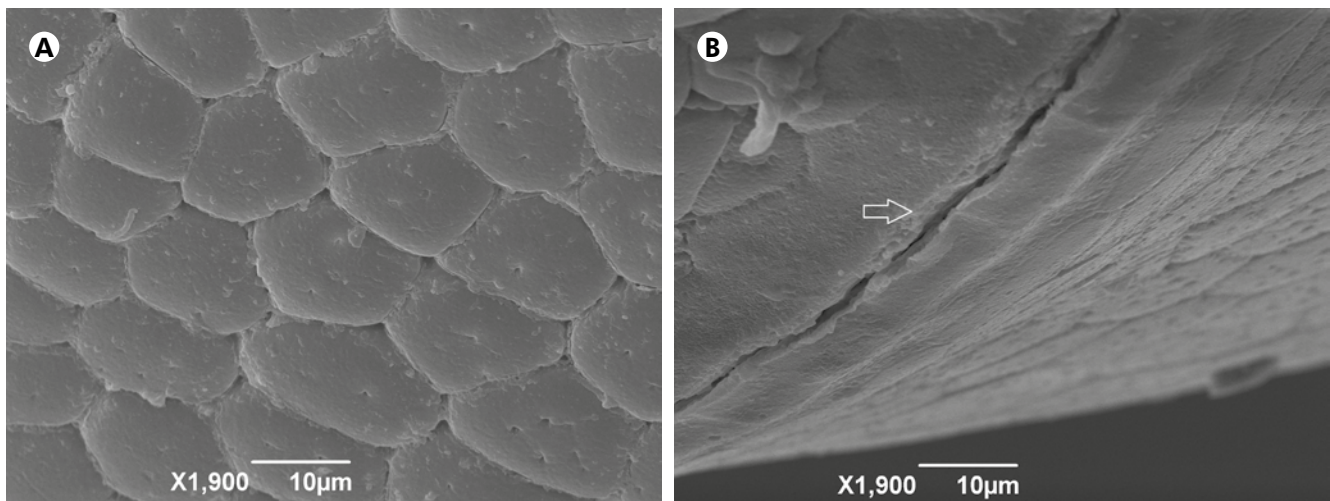
Linha limitante perde distinção à medida que se aproxima da borda: (a) Linha limitante pouco distinta; (b) Linha limitante bem distinta.

Figura 2 – *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013: células próximas à borda do ovo em seu primeiro terço



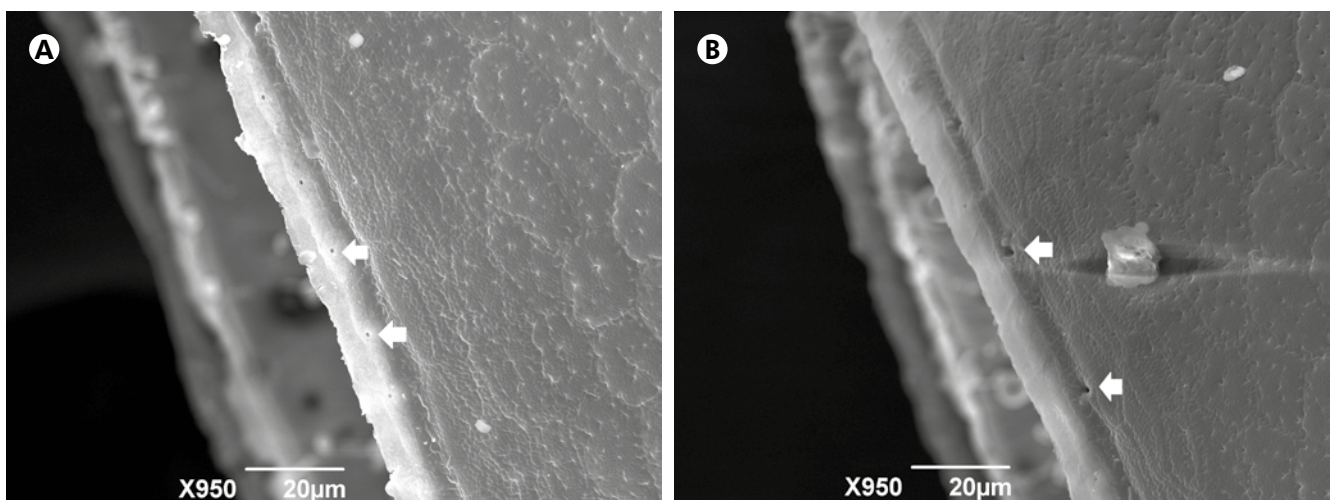
A: Ultraestrutura das células no segundo terço da extensão do ovo; **B:** Estrutura do exocório do último terço do corpo do ovo formada por células poligonais e perfurações aparentes nas células hexagonais.

Figura 3 – Células do segundo e do último terços do ovo de *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013



A: Opérculo com células poligonais com aspecto abaulado e levemente proeminentes, evidenciando perfurações em algumas células; **B:** Opérculo apenso à borda do ovo, com evidente fenda na junção.

Figura 4 – Opérculo de *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013



A: Borda do ovo com presença de aerópilas; **B:** Borda do ovo com formato regular em toda sua extensão e, em destaque, as micrópilas bem aparentes na borda do ovo.

Figura 5 – Borda do ovo de *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013

A observação de estruturas características, como aerópilas e micrópilas, em torno da borda, mostrou que essas estão distribuídas de forma regular, com existência de fenda na junção do opérculo com a borda do ovo. Também foi observada a ausência de colo e colarinho.

DISCUSSÃO

Desde que Galliard, em 1935, demonstrou a importância das estruturas exocoriais, por variarem de espécie para espécie, os triatomologistas tiveram acesso a uma nova ferramenta no rol dos elementos a serem analisados para caracterizar uma espécie. Dessa forma, foi possível ampliar o conceito específico e aumentar as condições de controle desses vetores da doença de Chagas que possuem ciclos biológicos característicos, dependendo de temperatura, umidade e fontes alimentares.

A caracterização da ornamentação do exocório, tamanho, forma e a presença ou ausência de determinadas estruturas servem de parâmetros para a definição ou diferenciação de algumas espécies¹⁷. Barata¹³ evidenciou a importância dessas estruturas para a diferenciação de 10 espécies do gênero *Rhodnius*, criando uma chave dicotômica baseada nas características morfológicas dos ovos. Posteriormente, Gonçalves et al.¹⁸, Rosa et al.¹⁶ e Santos-Mallet et al.¹⁰ também evidenciaram a importância dessas estruturas na caracterização de espécies do gênero *Triatoma*.

T. pintodiasi é uma espécie críptica em relação à *T. circummaculata* e faz parte do subcomplexo *T. rubrovaria*, que é composto por mais cinco espécies: *T. carcavallo*; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent & Galvão, 2001; *Triatoma limai* Del Ponte, 1929; *Triatoma oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939); e *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843).

O perfil morfométrico, obtido por meio da mensuração das dimensões dos ovos, permitiu a observação da diferença nas médias quando comparadas diretamente com os trabalhos de Rosa et al.¹⁶ e Cardozo-de-Almeida et al.¹¹ sobre *T. circummaculata*. Porém, neste estudo, não pôde ser

realizada uma análise estatística comparativa, devido à ausência dos dados brutos originais dos autores supracitados e homogeneidade de software, onde qualquer análise feita de forma aleatória poderia fornecer uma falsa significância.

A *T. pintodiasi* apresentou similaridades em relação à *T. circummaculata* quando comparada com os estudos de Rosa et al.¹⁶ e Cardozo-de-Almeida et al.¹¹; porém, a configuração exocorial, no primeiro terço da borda, apresentou morfologia diferente entre as espécies.

CONCLUSÃO

A morfologia dos ovos de *T. pintodiasi* foi observada, pela primeira vez, utilizando-se a técnica de MEV e apresentou similaridades estruturais na configuração exocorial com *T. circummaculata*, sendo a configuração no primeiro terço da borda uma característica importante que pode servir de base para estudos mais aprofundados sobre essas espécies.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Vigilância em Saúde; à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde; à Dra. Carolina Dale (Fiocruz) pelo incentivo, sugestões e revisão; à Dra. Dayse Rocha (Fiocruz) pelo incentivo e sugestões; à Dra. Silvana Thiengo (Fiocruz) pelo uso do aparelho de obtenção de fotos; e aos colegas de Laboratório: Airtton Jarbas, Maria Emília dos Reis Portela, Bruno Soares e Magaly Dolsan pelo apoio e incentivo.

CONFLITOS DE INTERESSE

Não houve conflitos de interesse.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram com a idealização do estudo, a análise e a interpretação dos dados e com a redação do manuscrito, aprovando a versão final publicada. Declaram-se responsáveis pelo conteúdo integral do artigo, garantindo sua precisão e integridade.



REFERÊNCIAS

- Jurberg J, Cunha V, Cailleaux S, Raigorodski R, Lima MS, Rocha DS, et al. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Pan-Amaz Saude. 2013 mar;4(1):43-56.
- Bedin C, Mello F, Wilhelms TS, Torres MA, Estima C, Ferreira CF, et al. Vigilância ambiental: doença de Chagas no Rio Grande do Sul. Bol Epidemiol. 2009 set;11(3):1-8.
- Aleixo A. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. Megadiversidade. 2009 dez;5(1-2):87-95.
- Mayr E. Systematics and the origin of species. New York: Columbia University Press; 1942.
- Jurberg J, Lent H, Galvão C. Genitalia dos machos e sua importância em Taxonomia. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, editores. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998. Vol. 1; p. 85-106.
- Jurberg J, Barbosa HS, Galvão C, Rocha DS, Silva MBA. Descrição de ovos e ninfas de *Triatoma klugi* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Iheringia, Ser Zool. 2010 mar;100(1):43-54.

- 7 Santos MC, Jurberg J, Galvão C, Lent H. Análise morfológica comparativa do complexo salivar dos Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Entomol Vect. 1997;4:155-62.
- 8 Haridass ET. Ultrastructure of the eggs of Reduviidae: III. Eggs of Triatominae and Echtrichodiinae (Insecta-Heteroptera). Proc Indian Acad Sci (Anim Sci). 1986 Jul;95(4):447-56.
- 9 Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr. VD, et al. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Rio de Janeiro: Fiocruz; 2015. 61 p.
- 10 Santos-Mallet JR, Cardozo-de-Almeida M, Novo SC, Gonçalves TCM. Morfologia externa de *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) através da microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. EntomoBrasilis. 2008;1(2):37-42.
- 11 Cardozo-de-Almeida M, Castro-de-Souza S, Oliveira MLR, Almeida SAS, Gonçalves TCM, Santos-Mallet JR. Ultrastructure and morphometry of eggs of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). Zootaxa. 2013;3750(4):348-56.
- 12 Barata JMS. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998. Vol. 2; p. 409-48.
- 13 Barata JMS. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae. II – Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera – Reduviidae). Rev Saude Publica. 1981 out;15(5):490-542.
- 14 Pinto C. Biologia do *Triatoma brasiliensis* Neiva. Sci Med. 1924;2:541-3.
- 15 Galliard R. Recherches sur les réduvidés hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. IV - Organes génitaux femelles. Ann Parasitol Hum Comp. 1935;13:497-527.
- 16 Rosa JA, Barata JMS, Santos JLF, Cilense M. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Rev Saude Publica. 2000 out;34(5):538-42.
- 17 Lent H, Wygodzinsky PW. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Am Mus Nat Hist. 1979;163(3):123-520.
- 18 Gonçalves TCM, Jurberg J, Costa JM, Souza W. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 jul-set;80(3):263-76.
- 19 Jurberg J, Galvão C, Rocha DS, Moreira FFF, Dale C, Rodrigues JMS, et al. Vetores da doença de Chagas no Brasil - coleção de cinco blocos (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste, Centro-oeste). Rio de Janeiro: Fiocruz; 2013.

Recebido em / Received: 22/4/2017
Aceito em / Accepted: 28/11/2017

Como citar este artigo / How to cite this article:

Lamas Jr. VD, Peixoto SR, Barbosa HS, Guimarães HL, Jurberg J. Análise morfológica de ovos de *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) por microscopia eletrônica de varredura. Rev Pan-Amaz Saude. 2018 abr-jun;9(2):51-56. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232018000200007>