

Análisis morfológica de huevos de *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) por microscopía electrónica de barrido

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

RESUMEN

OBJETIVO: Ampliar el conocimiento de la morfología de los huevos de *Triatoma pintodiasi*, por las técnicas de microscopía óptica y de microscopía electrónica de barrido (MEB), posibilitando la visualización de aspectos que servirán de parámetros para la caracterización y la identificación de esa especie. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Para la microscopía óptica, se seleccionaron 12 huevos, enseguida a la postura, observados a través de lupa estereoscópica para visualización de las estructuras y comparación de las medidas. Para la morfometría, se utilizó la escala en lámina micrométrica y, posteriormente, fue analizada por un software, con el objetivo de obtener la media y el desvío estándar. Para la selección de las áreas y observaciones de sus estructuras, se seleccionaron 10 huevos, que fueron preparados, metalizados con oro y llevad a la MEB. El cuerpo del huevo se dividió en tres áreas, con perforaciones en tres células de cada área, para minimizar la fracción de errores de conteo y de la mensuración de estructuras. **RESULTADOS:** Los huevos medían, promedio, 1,51 mm de largo y 0,89 mm de ancho, cuerpo con el exocorion en el primer tercio de la extensión del huevo presentando células poligonales, variando entre pentagonales y hexagonales. Las células del cuerpo presentaron perforaciones esparcidas, variando entre 21–35 orificios en cada célula. Opérculo levemente prominente formado por células poligonales arqueadas. **CONCLUSIÓN:** El análisis de los huevos reveló que *T. pintodiasi* demuestra similitudes estructurales con *Triatoma circummaculata*, sin embargo, la configuración del primer tercio del exocorion es una característica representativa importante y puede servir de base para estudios más profundos sobre esas especies.

Palabras clave: Reduviidae; Triatominae; Enfermedad 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.

Correspondencia / 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



<http://revista.iec.gov.br>

Rev Pan-Amaz Saude 2018; 9(2):1-6 – e-ISSN: 2176-6223

INTRODCCIÓN

Triatoma pintodiasi Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) es una especie críptica del subcomplejo *Triatoma rubrovaria* que presenta gran semejanza morfológica con la *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859). Sus principales diferencias, en relación a la *T. circummaculata* y a la *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, están en la pigmentación del lóbulo posterior del pronoto, en la morfología de la genitalia del macho, en las proporciones morfométricas de la cabeza y en la dosis de proteínas presentes en la hemolinfa¹. Esas tres especies neotropicales son simpátricas, y pueden ser encontradas viviendo en rocas y pedregales en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil, y raramente observadas en el intra y peridomicilio, y, hasta el momento, solamente la *T. circummaculata* fue hallada naturalmente infectada por el *Trypanosoma cruzi*^{1,2}.

En el proceso de identificación y clasificación de estos vectores de la enfermedad de Chagas, el conocimiento taxonómico adecuado es fundamental para la delimitación interespecífica de las especies. Debido al proceso continuo de especiación, existen dificultades o incluso, impedimentos para la delimitación de ciertos taxones^{3,4} y, por lo tanto, se han incorporado algunas herramientas en la taxonomía morfológica clásica, para ayudar a identificar caracteres que servirán como parámetros para la correcta delineación de una especie. Entre los enfoques, se puede citar el estudio comparativo de la morfología de los genitales de los machos y las técnicas bioquímicas, moleculares y estadísticas^{1,5,6,7}. En este contexto, la microscopía electrónica de barrido (MEB) se ha convertido en un gran aliado de la taxonomía en el estudio de la Triatominae debido a su efectividad, demostrando excelentes resultados a través del análisis estructural de una superficie, dándole mayor resolución, permitiendo observar estructuras que no pueden observarse bajo microscopía óptica y, por lo tanto, ayudan en la descripción de nuevas especies y estudios taxonómicos^{8,9,10,11,12}.

Un análisis morfológico comparativo, elaborado por Barata¹³, detalló las características macroscópicas y exocoriales de 10 especies del género *Rhodnius* Stål, 1859, observadas a través de la técnica de MEB, posibilitando organizar una clave para las mismas. Los resultados de tal estudio corroboraron las tesis de Pinto¹⁴ y de Galliard¹⁵, entre los primeros a establecer que la ornamentación del exocorion de los huevos de triatóminos podría usarse en la identificación de algunas especies.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento y la caracterización de la especie *T. pintodiasi*, la morfología de los huevos se describió utilizando las técnicas de microscopía óptica y de MEB, incluyendo la caracterización de su perfil morfométrico y la comparación de su configuración exocorial con la *T. circummaculata*.

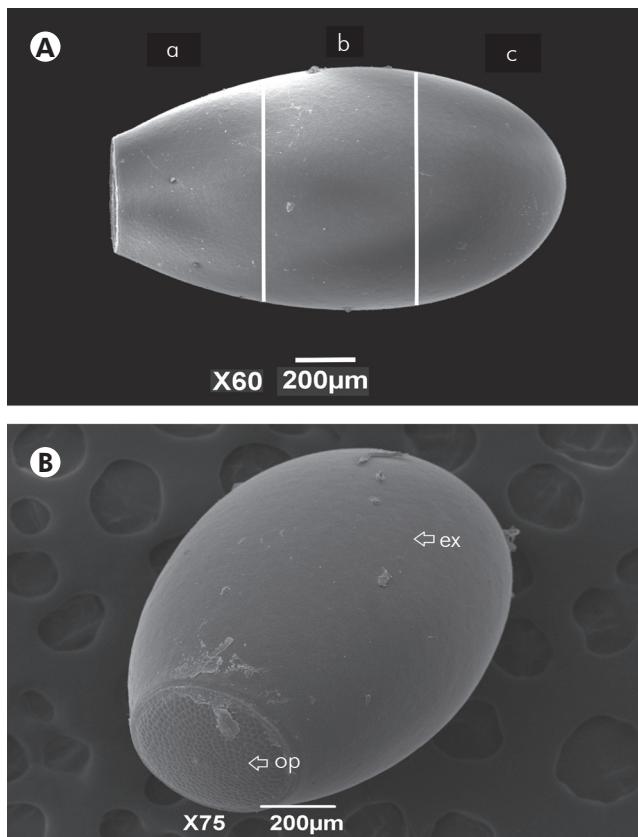
MATERIALES Y MÉTODOS

Cinco machos y siete hembras fueron separados para la formación de colonia y la consecuente obtención de huevos. Estos especímenes provenían de colonias

del insectario existente en el Laboratorio Nacional e Internacional de Referencia de Taxonomía de Triatóminos del Instituto Oswaldo Cruz (COI), Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz), y provenían de recolección en Rio Grande do Sul, Rincão dos Ventura en la ciudad de Santa Maria. Las colonias se mantuvieron en cristalizadores de vidrio, con soporte de madera y papel de filtro en el interior para aumentar la superficie de contacto y disminuir la humedad. La temperatura y la humedad se registraron dos veces al día (mañana y tarde).

Para la microscopía óptica, se seleccionaron 12 huevos inmediatamente después de la puesta, que se observaron a través de lupa estereoscópica ZEISS STEMI SV 11, para visualizar las estructuras y la comparación de las mediciones. Para la morfometría, utilizamos una escala en lámina micrométrica, que luego se procesó en el software Microsoft Office Excel 2007 para obtener el promedio y el desvío estándar (DE). Para el análisis estructural, se seleccionaron 10 huevos limpios, fijados en cinta adhesiva doble cara en stubs metálicos, luego metalizados con oro y llevados al MEB modelo JEOL JSM – 6390LV para la selección de áreas y observación de sus estructuras. Para minimizar la fracción de errores en el conteo y medición de las estructuras, el cuerpo del huevo se dividió en tres áreas (Figura 1A) con recuento de perforaciones en tres células en cada área.

Todo el material citado en los resultados está depositado en la Colección Herman Lent (IOC/Fiocruz).



A: División del exocorion – (a) primer tercio, (b) segundo tercio, (c) tercio final; **B:** Visión general del huevo – (ex) exocorion, (op) opérculo.

Figura 1 – Cuerpo del huevo de *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013

RESULTADOS

MICROSCOPIA ÓPTICA

Los huevos presentaron estructura simétrica y ausencia de "cuello" y "collar". Denotaron una coloración levemente anaranjada luego de la puesta, que se altera conforme a la madurez del embrión, traspasando a la pigmentación ligeramente rojiza. Midieron, en promedio, 1,51mm (DP = 0,03) de largo y 0,89mm (DP = 0,02) de ancho (Tabla 1), presentando 25% de incidencia de chanfleado lateral (aplanamiento lateral).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Cuerpo con exocorion (Figura 1B) en el primer tercio de la extensión del huevo, presentando células poligonales, con variación de pentagonales a hexagonales. Estas aparecieron, en su mayoría, poco delimitadas cuando próximas del borde (Figura 2) y con ausencia de cuello. En el segundo tercio del huevo, la arquitectura exocorial disponía de células pentagonales y hexagonales (Figura 3A). Las células del cuerpo presentaban perforaciones esparcidas,

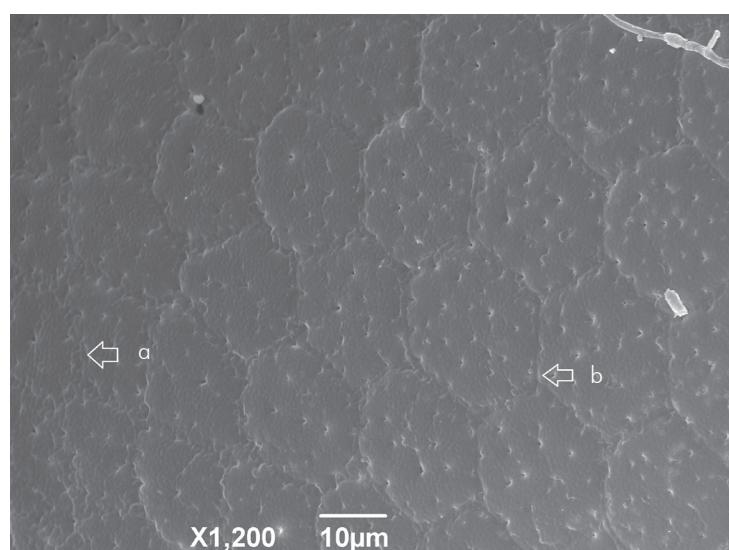
variando entre 21–35 orificios en cada célula (Figura 3B). Opérculo (Figura 1B) del tipo verdadero, levemente prominente, formado por células poligonales convexas (Figura 4A), en su mayoría hexagonales, con perforaciones distribuidas por todas las células y líneas limitantes bien aparentes con aspecto de surco (Figura 4A). Opérculo anexo al borde del huevo, con evidente hendidura en la unión (Figura 4B). Borde con formato regular en toda su extensión (Figura 5B), presencia de aerópilas (Figura 5A) y micrópilas (Figura 5B) en todo su contorno.

Al comparar las características obtenidas por el MEB de los huevos de *T. pintodiasi* con las discriminadas por Rosa et al.¹⁶ y Cardozo-de-Almeida et al.¹¹ para *T. circummaculata*, fue posible destacar las similitudes encontradas en la configuración exocorial de las células del opérculo, junto con las del cuerpo del huevo, destacando la no especificidad en la cantidad de perforaciones presentes en las células, enfatizando que esta es la primera descripción morfológica por el uso de MEB y morfométrica para huevos de *T. pintodiasi*.

Tabla 1 – Comparación entre los huevos de *T. pintodiasi* con los de *T. circummaculata* (descrito por Cardozo-de-Almeida et al.¹¹ y Rosa et al.¹⁶), mostrando la similitud de las estructuras del corion

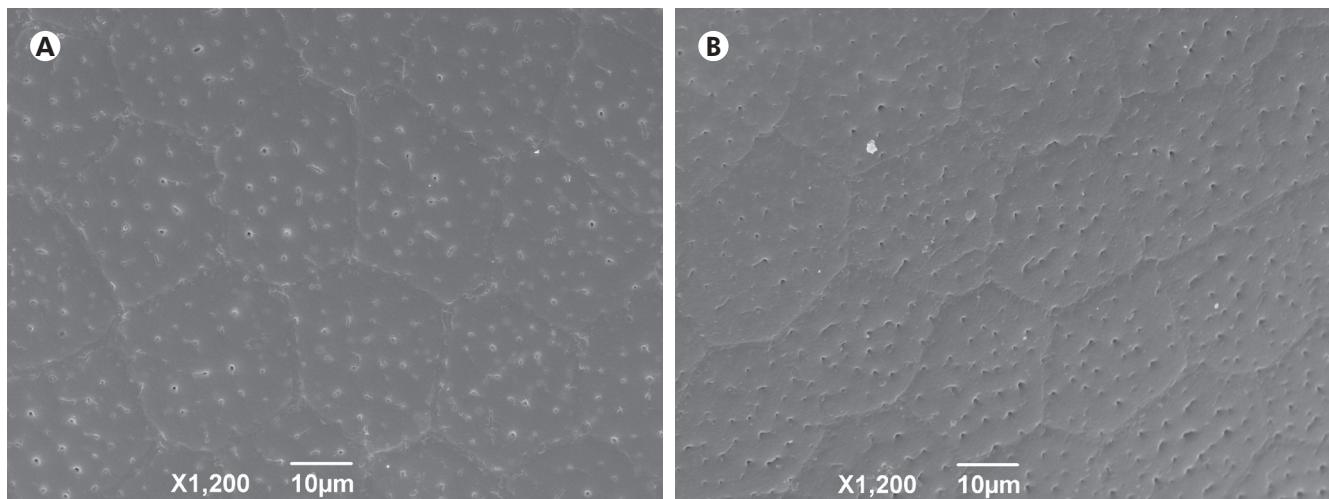
Especie	Largo/Ancho	Perforaciones por células	Formato de las células	Células del opérculo/ Formato del opérculo
<i>T. pintodiasi</i>	1,51/0,89 mm	21–35	Polygonales; existencia de algunas pentagonales, con mayoría hexagonal	Convexas, levemente prominentes
<i>T. circummaculata</i> (Cardozo-de-Almeida et al. ¹¹)	1,47/0,87 mm	35	Hexagonales	Convexas, levemente prominentes
<i>T. circummaculata</i> (Rosa et al. ¹⁶)	1,55/0,90 mm	Numerosas	Polygonales; existencia de algunas pentagonales, con mayoría hexagonal	Superficie acolchada, circular convexa

La morfometría de los huevos se presentó de forma esclarecedora, debido a la diferencia de softwares empleados en los estudios antes mencionados



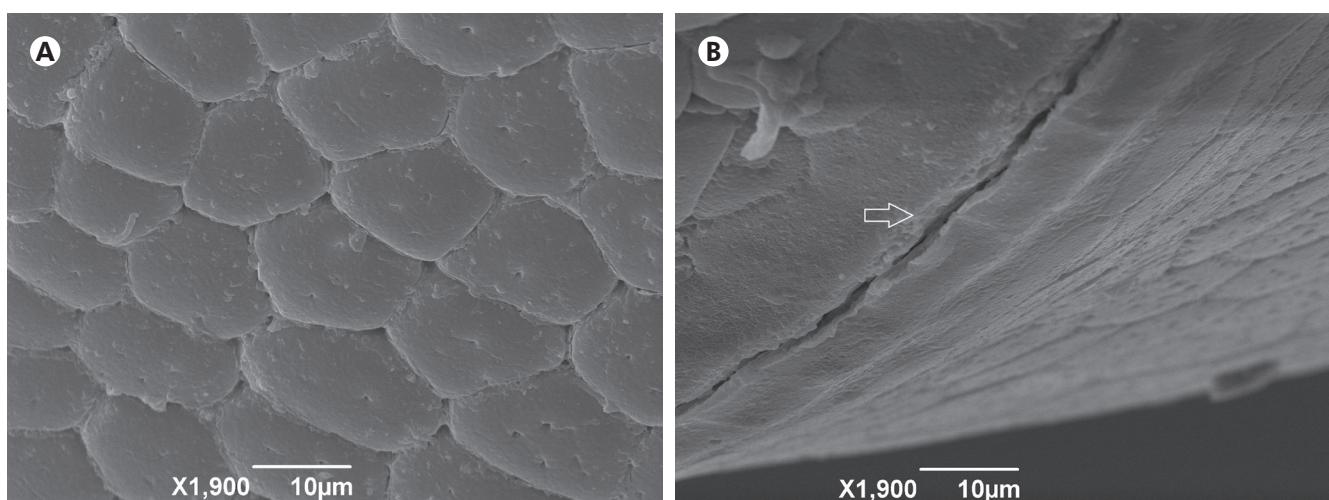
Línea limitante pierde distinción a medida que se aproxima del borde: (a) Línea limitante poco distinguible; (b) Línea limitante bien distinguible

Figura 2 – *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013: células próximas al borde del huevo en su primer tercio



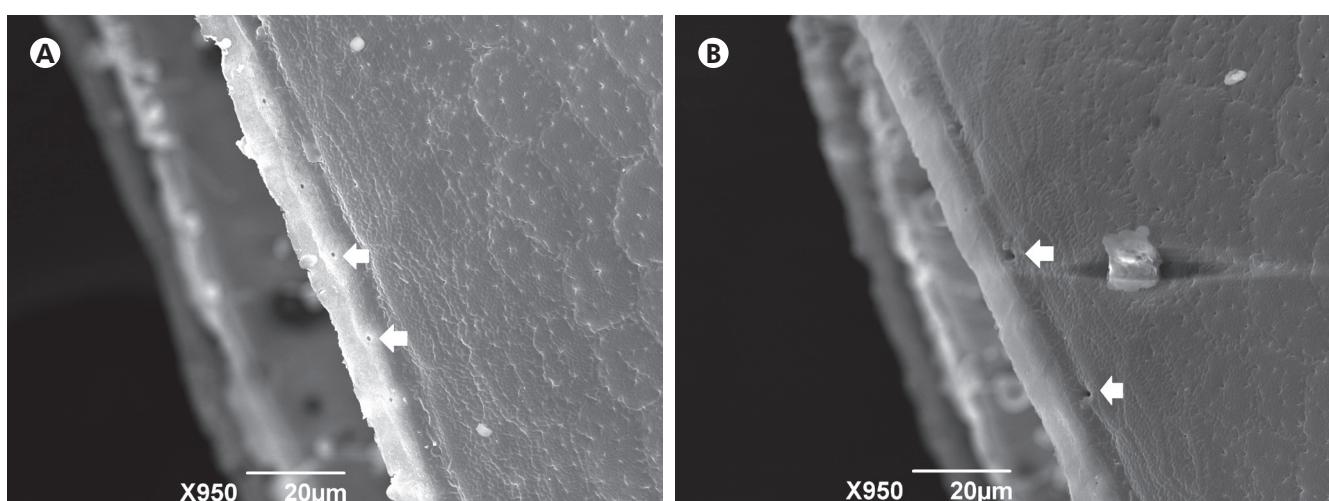
A: Ultraestructura de las células en el segundo tercio de la extensión del huevo; **B:** Estructura del exocorion del último tercio del cuerpo del huevo formada por células poligonales y perforaciones aparentes en las células hexagonales.

Figura 3 – Células del segundo y del último tercio del huevo de *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013



A: Opérculo con células poligonales de aspecto convexo y levemente prominentes, mostrando perforaciones en algunas células; **B:** Opérculo anexo al borde del huevo, con evidente fisura en la unión.

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



A: Borde del huevo con presencia de aerópilas; **B:** Borde del huevo con formato regular en toda su extensión y, en destaque, las micrópilas bien aparentes en el borde del huevo.

Figura 5 – Borde del huevo de *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013

La observación de estructuras características, como las aerópilas y micrópilas, alrededor del borde, mostró que están distribuidas uniformemente, con una fisura en la unión del opérculo y el borde del huevo. También se observó la ausencia de cuello y collar.

DISCUSIÓN

Desde que Galliard, en 1935, demostró la importancia de las estructuras exocoriales, por que varían de especie para especie, los especialistas en triatóminos tuvieron acceso a una nueva herramienta en la lista de los elementos a ser analizados para caracterizar una especie. De esa forma, fue posible ampliar el concepto específico y aumentar las condiciones de control de esos vectores del Mal de Chagas que tienen ciclos biológicos característicos, dependiendo de temperatura, humedad y fuentes alimentarias.

La caracterización de la ornamentación del exocorion, el tamaño, la forma y la presencia o ausencia de ciertas estructuras sirven como parámetros para la definición o diferenciación de algunas especies¹⁷. Barata¹³ mostró la importancia de estas estructuras para la diferenciación de 10 especies de *Rhodnius*, creando una clave dicotómica basada en las características morfológicas de los huevos. Posteriormente, Gonçalves et al.¹⁸, Rosa et al.¹⁶ y Santos-Mallet et al.¹⁰ también destacaron la importancia de estas estructuras en la caracterización de especies del género *Triatoma*.

T. pintodiasi es una especie críptica con respecto a *T. circummaculata* y forma parte del subcomplejo de *T. rubrovaria*, que se compone de otras cinco especies: *T. carcavalloi*; *Triatoma Klugi* Carcavalllo, Jurberg, Lent & Galvao, 2001; *Triatoma Del Ponte*, Lima, 1929; *Triatoma oliveirai* (Neiva, Pinto y Lent, 1939); y *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843).

El perfil morfométrico, obtenido midiendo las dimensiones de los huevos, permitió observar la diferencia de promedios cuando se comparó directamente con los estudios de Rosa et al.¹⁶ y Cardozo-de-Almeida et al.¹¹ sobre *T. circummaculata*. Sin embargo, en este estudio, no se pudo realizar un análisis estadístico comparativo

debido a la ausencia de los datos originales, sin procesar, de los autores citados y la homogeneidad del software, en el cual cualquier análisis aleatorio podría proporcionar un significado falso.

T. pintodiasi presentó similitudes en relación a *T. circummaculata* en comparación con los estudios de Rosa et al.¹⁶ y Cardozo-de-Almeida et al.¹¹; sin embargo, la configuración exocorial en el primer tercio del borde mostró una morfología diferente entre las especies.

CONCLUSIÓN

La morfología de los huevos de *T. pintodiasi* se observó, por primera vez, utilizando la técnica de MEB y mostró similitudes estructurales en la configuración exocorial con *T. circummaculata*, siendo que, la configuración en el primer tercio del borde es una característica importante que puede servir de base para estudios más profundos sobre esas especies.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Vigilancia en Salud; a la Coordinación General de Laboratorios de Salud Pública del Ministerio de Salud; a la Dra. Carolina Dale (Fiocruz) por el incentivo, sugerencias y revisión; a la Dra. Dayse Rocha (Fiocruz) por el incentivo y sugerencias; a la Dra. Silvana Thiengo (Fiocruz) por el uso del aparato de obtención de fotos; y a los colegas de Laboratorio: Airton Jarbas, Maria Emilia dos Reis Portela, Bruno Soares y Magaly Dolsan por el apoyo e incentivo.

CONFLICTOS DE INTERÉS

No hubo conflictos de interés.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Todos los autores contribuyeron con la ideación del estudio, el análisis y la interpretación de los datos y con la redacción del manuscrito, aprobando la versión final publicada. Se declaran responsables por el contenido integral del artículo, garantizando su precisión e integridad.



REFERENCIAS

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Aleixo A. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. Megadiversidade. 2009 dez;5(1-2):87-95.
- 4 Mayr E. Systematics and the origin of species. New York: Columbia University Press; 1942.
- 5 Jurberg J, Lent H, Galvão C. Genitália dos machos e sua importância em Taxonomia. In: Carcavalllo 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.
- 6 Jurberg J, Barbosa HS, Galvão C, Rocha DS, Silva MBA. Descrição de ovos e ninhas 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 carcavalloi* 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 carcavalloi* 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* Stål, 1859 (Hemiptera – Reduviidae). *Rev Saude Publica.* 1981 out;15(5):490-542.
- 14 Pinto C. Biología 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 ninhas 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.

Recibido en / Received: 22/4/2017
Aceptado en / Accepted: 28/11/2017

Se refiere al doi: 10.5123/S2176-62232018000200007, publicado originalmente en portugués.

Traducido por: Lota Moncada

Cómo citar este artículo / How to cite this article:

Lamas Jr. VD, Peixoto SR, Barbosa HS, Guimaraes HL, Jurberg J. Análisis morfológica de huevos de *Triatoma* pintodiasi Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) por microscopía electrónica de barrido. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2018 abr-jun;9(2):1-6. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232018000200007>