

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TESE**

Aspectos morfológicos, filogenéticos, morfométricos e biológicos de espécies do “subcomplexo rubrovaria” (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).

**MARGARETH ALVES RIBEIRO CARDOZO DE ALMEIDA**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FILOGENÉTICOS, MORFOMÉTRICOS E  
BIOLÓGICOS DE ESPÉCIES DO “SUBCOMPLEXO RUBROVARIA”  
(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).

***MARGARETH ALVES RIBEIRO CARDOZO DE ALMEIDA***

*Sob a Orientação da Doutora*  
**Jacenir Reis dos Santos Mallet**  
*e co-orientação da Doutora*  
**Teresa Cristina Monte Gonçalves**

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau  
de **Doutor em Ciências**, no  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal

Seropédica, RJ  
Novembro de 2012

595.754

A447a

T

Almeida, Margareth Alves Ribeiro  
Cardozo de, 1970-

Aspectos morfológicos,  
filogenéticos, morfométricos e  
biológicos de espécies do  
"Subcomplexo Rubrovaria" (Hemíptera:  
Reduviidae : Triatominae) /  
Margareth Alves Ribeiro Cardozo de  
Almeida. - 2012.

139 f.: il.

Orientador: Jacenir Reis dos  
Santos Mallet.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal.

Bibliografia: f. 30-44.

1. Hemíptera - Teses. 2.  
Hemíptera - Morfologia - Teses. 3.  
Hemíptera - Filogenia - Teses. 4.  
Hemíptera - Genética - Teses. I.  
Mallet, Jacenir Reis dos Santos,  
1958-. II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Animal.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**MARGARETH ALVES RIBEIRO CARDOZO DE ALMEIDA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Biologia Animal.

TESE APROVADA EM 27/11/2012

---

Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – FIOCRUZ/RJ  
(Orientadora)

---

Dra. Nadja Lima Pinheiro – UFRRJ/RJ

---

Dra. Suzete Araújo Oliveira Gomes – UFF/RJ

---

Dr. Carlos Eduardo de Almeida – UNESP/SP

---

Dra. Simone Patrícia Carneiro de Freitas – FIOCRUZ/BA

---

Dra. Sílvia dos Santos Menezes – FIOCRUZ/RJ (Suplente)

---

Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz – FIOCRUZ/RJ (Suplente)

*Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu nem cochilei  
Os mais belos montes escalei  
Nas noites escuras de frio chorei*

*A vida ensina e o tempo traz o tom  
Pra nascer uma canção  
Com a fé do dia a dia  
Encontro a solução  
Encontro a solução...*

*... Meu caminho só meu Deus pode mudar  
Meu caminho só meu pai  
Meu caminho só meu pai*

*(Cidade Negra)*

*A Deus por ser protetor e luz do meu caminho.*

***Dedico***

*À minha filha Rafaela, razão do meu viver, vida da minha vida, te amo.*

*À minha mãe Georgette Alves Ribeiro, por ser a mãe  
mais dedicada do mundo, devo tudo que sou.*

*Ao meu marido Sérgio Antônio Silva de Almeida,  
pela amizade, incentivo, amor e  
companheirismo nas horas mais difíceis de minha vida.*

*À minha madrinha Zenir Ribeiro de Andrade (in memorian),*

*meu tio Luiz Carlos de Andrade (in memorian),*

*meu padrinho Cesar Luiz Ribeiro de Andrade (in memorian)*

*e meu primo José Roberto Ribeiro Nogueira (in memorian)*

*pelo afeto e apoio, que saudades.*

**Dedico**

*À Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet  
pela amizade, compreensão, determinação,  
paciência, confiança e alegria  
com que me orientou não somente em minha  
vida científica, profissional como pessoal.*

***Dedico***



Numa folha qualquer, eu desenho um sol amarelo  
E com cinco ou seis retas é fácil fazer um castelo...

Corro o lápis em torno da mão e me dou uma luva  
E se faço chover com dois riscos tenho um guarda-chuva...

Se um pinguinho de tinta cai num pedacinho azul do papel  
Num instante imagino uma linda gaivota a voar no céu...

Vai voando, contornando a imensa curva Norte e Sul  
Vou com ela, viajando Havaí, Pequim ou Istambul  
Pinto um barco a vela, brando navegando  
É tanto céu e mar num beijo azul...

Entre as nuvens, vem surgindo um lindo avião rosa e grená  
Tudo em volta colorindo com suas luzes a piscar...

Basta imaginar e ele está partindo, sereno e lindo  
Se a gente quiser, ele vai pousar...

Numa folha qualquer, eu desenho um navio de partida  
Com alguns bons amigos, bebendo de bem com a vida...

De uma América a outra, eu consigo passar num segundo  
Giro um simples compasso  
E num círculo eu faço o mundo...

Um menino caminha e caminhando chega no muro  
E ali logo em frente a esperar pela gente  
O futuro está...

E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar  
Não tem tempo, nem piedade, nem tem hora de chegar  
Sem pedir licença, muda a nossa vida  
E depois convida a rir ou chorar...

Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá  
O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar  
Vamos todos numa linda passarela de uma aquarela  
Que um dia enfim descolorirá...

Numa folha qualquer, eu desenho um sol amarelo  
(Que descolorirá!)  
E com cinco ou seis retas é fácil fazer um castelo  
(Que descolorirá!)  
Giro um simples compasso num círculo eu faço o mundo  
(Que descolorirá!)

**Aquarela (Toquinho)**

## AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet pela confiança em mim depositada, incentivo, amizade, carinho, compreensão, conselhos (que não foram poucos), dedicação, e muito mais... Fatores fundamentais para o meu crescimento científico, profissional e pessoal... o meu muito obrigado.

A minha co-orientadora Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves, por ter aceito me orientar, pela paciência e compreensão e pelas importantes sugestões para melhor andamento dos trabalhos.

A MSc. Simone Teves pela parceria, amizade e seriedade nos momentos de extrema necessidade deste trabalho.

A amiga de sempre Ana Paula Rufino Amaro Sant'Anna pela atenção e auxílio na criação dos triatomíneos.

A MSc. Nathanielly Rocha pela amizade e apoio durante a realização dos trabalhos.

A MSc. Luciana Reboredo pelo carinho e incentivo durante a tese.

A Dra. Ana Laura Carbajal de La Fuente pela amizade e apoio na realização da tese.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Almeida por importantes sugestões durante a realização dos trabalhos e revisão da tese.

Ao Dr. Alfredo Carlos Azevedo pelo auxílio com os dados estatísticos e pela sua amizade.

A toda equipe do Setor de Entomologia Médica e Forense pelos agradáveis momentos de convivência, me apoiando e incentivando.

A Esther (Estherzinha), secretária do apoio laboratorial do IOC, por sua com alegria e sempre disponível quando solicitada.

A Carla Saldanha, secretária do apoio laboratorial do IOC, pela ajuda quando requisitada.

A MSc. Cleonara Bedin do Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretária Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde - CEVS pela presteza com o que atendeu a minha solicitação no envio de exemplares de triatomíneos.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ pelos importantes ensinamentos.

A querida Agra, secretária da Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ pela atenção, amizade e ajuda sempre que requisitada.

A minha amiga e comadre Viviane pela amizade, atenção e momentos agradáveis.

A minha amiga de sempre Eliane pela amizade, presteza, carinho e atenção.

Aos meus tios (*in memoriam*) Zenir e Lula e meu padrinho (*in memoriam*) Cesar pelo afeto e carinho em momentos difíceis, que saudades imensas.

A Brigitte, Jade, Linda e *in memoriam*: Clara, Dino, Luna, Pet, Titã e Zeus por me amarem tanto e tornarem minha vida mais alegre.

Ao meu sogro Waldemiro e meu cunhado Fábio pelos bons momentos de convívio.

A minha família Ribeiro, primos queridos, por todo carinho e alegria durante os nossos encontros.

A minha mãe Georgette pela paciência, amor, dedicação e cuidado sempre dedicado a mim... Te amo muito, minha mãe querida.

Ao meu amigo, marido e companheiro Sérgio pela dedicação, amor, carinho e apoio durante sempre... Eu amo muito você.

A minha filha Rafaela pelo carinho, sorrisos que tanto me alegram e amor incondicional... Melhor coisa que aconteceu na minha vida. Te amo sobre todas as coisas.

*A todos muito obrigada!*

## RESUMO

Nesta tese foram estudadas três espécies do “subcomplexo rubrovaria”: *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* que possuem hábitos silvestres, mas com potencialidades na transmissão da doença de Chagas. Estas espécies são encontradas com frequência em domicílios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram feitas comparações entre as três espécies através da morfologia usando a técnica da microscopia ótica e eletrônica de varredura. Foram ilustradas as diferenças morfoestruturais dos adultos na região escutelar e apenas uma espécie apresentou a forma codiforme na depressão mediana, *T. circummaculata*. Já *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* apresentaram a forma de W. Foi também observada a concentração de sensilas nas superfícies do escutelo das três espécies. Nas análises da região cefálica, o sulco estridulatório é em forma de “U” em *T. circummaculata* e em forma de “V” em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria*, as búculas de *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* apresentaram a forma de “U” e *T. circummaculata* de “V”. Já o rostro de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* apresentaram duas fendas laterais 1+1 no ápice. Foram analisadas e evidenciadas diferenças significativas no comprimento, largura e diâmetro do corpo e do opérculo dos ovos de *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* e *T. circummaculata*. Na análise morfológica das antenas de *T. carcavalloi* verificou a ocorrência tanto em machos quanto em fêmeas de mais de 14 tricobótrias, no terceiro e quarto artículos antenais. *T. carcavalloi* apresentou na cabeça 1+1 manchas pós-ocelares. Nos fêmures das patas de ambos os sexos foi encontrado um par de dentículos subapicais. As fossetas esponjosas foram encontradas somente nos machos, nas tíbias das patas anteriores e medianas. Os resultados morfológicos de *T. carcavalloi* evidenciaram que algumas estruturas são importantes para a caracterização específica, como: antenas, dentículos subapicais e fossetas esponjosas. Estudos morfológicos colocaram *T. carcavalloi* no “complexo infestans” e no “subcomplexo rubrovaria” assim como *T. rubrovaria*, enquanto *T. circummaculata* foi colocado no “complexo circummaculata”. A filogenia do grupo composto de 16 espécies de triatomíneos foi reavaliado com a inclusão de *T. carcavalloi* por análise Bayesiana utilizando sequências de mtDNA de subunidades 12S e 16S do RNA ribossomal, e genes do citocromo oxidase I (COI). A relação fenotípica entre *T. carcavalloi* e triatomíneos afins também foi inferida a partir da morfometria. Resultados filogenéticos indicaram que *T. carcavalloi* é uma espécie irmã de *T. rubrovaria*, e ambos foram recolocados em estreita relação com *T. circummaculata*. Estudos morfométricos confirmaram a proximidade entre *T. carcavalloi*, *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*, colocando a última espécie no “complexo infestans” e no “subcomplexo rubrovaria”. Em relação ao parâmetro biológico, o período médio de incubação dos ovos em *T. carcavalloi* foi de 22,7 dias. O maior número de ovos / fêmea / semana foi observado durante os meses mais quentes e os ovos que não eclodiram eram férteis. O primeiro dia de repasto sanguíneo foi de 3,13 dias após a eclosão, em média. O período de intermuda N1-N2 foi em média de 18,52 dias; N2-N3 foi 62,77 dias; N3-N4 foi 86,93 dias; N4-N5 foi 119,05 dias e N5-adulto foi 193,43 dias. A média geral de alimentações durante todo o desenvolvimento ninfal foi de 13,4. Os resultados logrados para resistência ao jejum indicaram que as ninfas de 3, 4 e 5 estágios apresentam maior resistência do que os adultos, e neste caso os machos foram menos resistente do que as fêmeas. A taxa de mortalidade mais alta foi registrada em N3 (22,2%). A sobrevivência média foi de 25,6 semanas para os adultos. O ciclo de vida total foi longo, com média de 503,4 dias. Este foi o primeiro relato sobre a biologia de *T. carcavalloi* alimentados com camundongos. Esse estudo possibilitou ampliar o conhecimento bionômico desta espécie, além de contribuir para melhor manutenção de colônias e dessa forma entender a possível participação na transmissão do *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** Triatominae. Morfologia. Filogenia. Morfometria. Biologia.

## ABSTRACT

In this thesis we studied three species of "subcomplex rubrovaria": *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* and *T. rubrovaria* wild habits that have potential in transmission of Chagas disease. These species are often found in domiciles in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Comparisons were made between the three species by morphology using the technique of optical microscopy and scanning electron microscopy. We illustrate the morphostructural differences adults in scutellar region and only one species showed heart-shaped median depression, *T. circummaculata*. *T. carcavalloi* and *T. rubrovaria* presented in the form of W. It was also observed concentration of sensilla on the surfaces of the scutellum of these three species. In analyzes of the cephalic region, the stridulatory sulcus is "U" shaped in *T. circummaculata* and "V" shaped in *T. carcavalloi* and *T. rubrovaria*, the buccula *T. carcavalloi* and *T. rubrovaria* presented in the form of "U" and *T. circummaculata* "V" shaped. The rostrum of *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* and *T. rubrovaria* presented in apex two lateral rifts 1+1. Were analyzed and shown significant differences in the length, width and diameter of the body and operculum of the eggs of *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* and *T. circummaculata*. In the morphological analysis of antennas *T. carcavalloi* it was verified the occurrence in both sexes more than 14 trichobotrium, in the third and fourth antennal articles. *T. carcavalloi* presented on head 1+1 post-ocelares spots. In the legs, a pair of subapical denticles in femures of male and female was found. Spongy fossette were found only in the males, in the tibiae of the anterior and medium legs. The results of morphological *T. carcavalloi* showed that some structures are important for the specific characterization, such: antennas, spongy fossette and subapical denticles. Morphological studies placed *T. carcavalloi* in "complex infestans" and "subcomplex rubrovaria" as well as *T. rubrovaria*, while *T. circummaculata* was placed in the "complex circummaculata". The phylogeny of the group consists of 16 species of triatomines was reassessed with the inclusion of *T. carcavalloi* by Bayesian analysis of mtDNA sequences of subunits 12S and 16S ribosomal RNA, and cytochrome oxidase I gene (COI). The phenotypic relationship between *T. carcavalloi* related triatomines was also inferred from morphometry. Phylogenetic results indicate that *T. carcavalloi* is a sister species to *T. rubrovaria*, and both were relocated in close relationship with *T. circummaculata*. Morphometrics studies confirmed the proximity of *T. carcavalloi*, *T. rubrovaria* and *T. circummaculata*, placing the latter species the "complex infestans" and "subcomplex rubrovaria". Regarding biological parameter, the average incubation period of the eggs in *T. carcavalloi* was 22.7 days. The highest number of eggs/female/week was observed during the hottest months. The first meal took place at 3.13 days after hatching. The intermoulting period N1-N2 was on average 18.52 days, N2-N3 62.77, N3-N4 86.93, N4-N5 119.05 and N5-adult 193.43. The average of feedings during the nymphal development was 13.4. Resistance to fasting in all nymph and adult (males and females) stages indicated that nymphs of 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> stages presented higher resistance than adults, and in this case males were less resistant than females. The highest mortality rate was registered in N3 (22.2%). The average adult survival was 25.6 weeks. The total life cycle was highly long with average of 503.4 days. This is the first report on the biology of *T. carcavalloi* fed mice. This study enable expand the bionomic knowledge of this species, besides contribute to better maintenance colony and thus understand the possible participation in the transmission of *T. cruzi*.

**Key words:** Triatominae. Morphology. Phylogeny. Morphometry. Biology.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Fêmea de <i>Triatoma rubrovaria</i>	6
Figura 2	Fêmea de <i>Triatoma carcavallo</i>	8
Figura 3	Fêmea de <i>Triatoma circummaculata</i>	10

## SUMÁRIO

<b>1.0. Introdução</b>	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Triatomíneos	2
1.2.1. “Complexo infestans”	5
1.2.2. “Subcomplexo rubrovaria”	5
1.2.2.1. Posição sistemática das espécies brasileiras do “subcomplexo rubrovaria”	5
1.2.2.2. <i>Triatoma rubrovaria</i>	6
1.2.2.3. <i>Triatoma carcavallo</i>	8
1.2.2.4. <i>Triatoma circummaculata</i>	10
1.3. Morfologia dos Triatomíneos	11
1.4. Biologia dos Triatomíneos	13
1.5. O sequenciamento de DNA na caracterização dos Triatomíneos	14
<b>2.0. Capítulos</b>	16
2.1. Capítulo 1	16
2.1. Capítulo 2	17
2.1. Capítulo 3	18
2.1. Capítulo 4	19
2.1. Capítulo 5	20
<b>3.0. Discussão</b>	21
<b>4.0. Conclusões</b>	28
<b>5.0. Considerações finais</b>	29
<b>6.0. Referências bibliográficas</b>	30
<b>Anexos</b>	45

## 1.0 - INTRODUÇÃO

### 1.1. A doença de Chagas

A história da descoberta da doença de Chagas tem início em 1902, quando o estudante da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Carlos Chagas, foi interpelado por Miguel Couto a frequentar o órgão de pesquisa *Instituto Soroterápico*, criado em 1900 pelo Barão de Pedro Afonso. Em 1907, Carlos Chagas, solicitado agora por Oswaldo Cruz, segue para Estrada de Ferro Central do Brasil, em um pequeno vilarejo chamado Lassance, localizado ao norte de Minas Gerais, para controlar o surto de malária entre operários. No ano de 1909, Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas descobriu o primeiro caso humano da doença de Chagas, assim como determinou o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, seu completo ciclo de transmissão, além de identificar o vetor, *Panstrongylus megistus*, e o primeiro reservatório silvestre, tatu.

A doença de Chagas é endêmica em 21 países das Américas e seu principal mecanismo de transmissão é a vetorial (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2012). Esta doença é adquirida através das dejeções (urinofecal) do triatomíneo contendo formas infectantes, que, graças a sua motilidade penetram na mucosa ou por qualquer solução de continuidade da pele do animal receptor, quando o inseto realiza o repasto sanguíneo (MORAES, 2000). A transmissão transfusional no Brasil é responsável por 0,2% dos casos descritos (MORAES-SOUZA & FERREIRA-SILVA, 2011) e a transmissão congênita varia de 5 a 40% dependendo da área geográfica (TORRICO *et al.* 2004) e no Brasil oscila entre 0,3 e 33% (GONTIJO *et al.* 2009). Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012) no período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda, destes, 70% (877/1.252) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (92/1.252), em 22% (276/1.252) não foi identificada a forma de transmissão. Atualmente entre 60% e 70% das pessoas infectadas pelo parasita vivem em média de 65 a 70 anos, enquanto que, na década de 1970 a expectativa de vida era de 30 a 40 anos.

Segundo SCHMUNIS (1999), esta doença representa o quarto maior impacto social entre todas as doenças infecciosas e parasitárias prevalentes. A WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012) informou que mais de 25 milhões de pessoas encontram-se em risco de adquirir a doença de Chagas. SCHOFIELD *et al.* (2006) relatou que cerca de nove milhões de pessoas estejam infectadas. O CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2012) estimou que 8 a 11 milhões de pessoas encontram-se infectadas em todo mundo e destes, 15% a 30% possuem sintomas clínicos, além de que a maioria destas pessoas não sabem que estão infectadas.

Embora o Brasil tenha reduzido de forma drástica estes números, nas últimas décadas segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012), entre 150 e 200 novos casos ainda são registrados anualmente, e no Brasil a doença acomete cerca de três milhões de pessoas. A ocorrência da doença de Chagas tem sido observada em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina, São Paulo), com maior frequência de casos e surtos registrados na região da Amazônia Legal e mais de 95% ocorrem em apenas dois Estados: Pará e Amapá, sendo o processamento de açaí e outros alimentos o principal foco de contágio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A doença de Chagas não foi vista como problema de saúde até à década de '60. Primitivamente considerada enzootia, passou a ser uma antropozoonose, a partir da domiciliação dos vetores, deslocados de seus ecótopos silvestres, pela atividade antrópica no ambiente natural, como a destruição da vegetação pela agricultura,

acarretando desequilíbrios nos ecossistemas. Os vetores passaram a ocupar os nichos deixados vagos pela eliminação do *Triatoma infestans* (Klug, 1834), possibilitando, dessa maneira, a manutenção da transmissão da doença de Chagas no peri e intradomicílio por espécies originalmente silvestres (VINHAES & DIAS, 2000).

Segundo a OPAS (2012) são reconhecidos três ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909): um ciclo silvestre, um peridoméstico e um doméstico. O primeiro constitui o ciclo original da tripanossomíase americana, do qual participam mais de duzentas espécies entre hospedeiros e triatomíneos silvestres. O *T. cruzi* circula entre mamíferos silvestres e o inseto vetor. Entretanto, a doença de Chagas nesses animais permanece com muitas dúvidas, pois nem todos desenvolvem a doença e também devido a complexidade dos inúmeros hospedeiros e vetores envolvidos. No ciclo peridoméstico, algumas espécies de triatomíneos podem assumir uma biologia especial, adaptando-se a viver em áreas em torno das habitações humanas, como: telheiros, sótãos, chiqueiros, galinheiros, etc, nutrindo do sangue de animais domésticos. É importante ressaltar que uma mesma espécie de triatomíneo pode ser encontrada tanto no domicílio como no peridomicílio. No ciclo doméstico participam o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares (ARGOLO *et al.* 2008).

De acordo com GURGEL-GONÇALVES *et al.*, (2012) não há vacinas para a doença de Chagas nem tratamentos antiparasitários para curar a fase crônica, sendo o controle de vetores domiciliados a principal estratégia para prevenir a infecção humana. O controle da doença de Chagas no período 1996-2012 está baseado na pulverização das casas e zonas circundantes com inseticidas; melhoria das habitações para evitar a infestação do vetor; medidas preventivas com o uso de mosquiteiros; boas práticas de higiene na preparação de alimentos, transporte, armazenamento e consumo; triagem de doares de sangue; teste de tecido, órgão ou células de doadores e receptores; triagem de recém nascidos ou outras crianças de mães infectadas para permitir o diagnóstico precoce e tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012) é importante o envolvimento das secretarias municipais de educação e supervisores pedagógicos, para o estabelecimento das estratégias de envolvimento, na rede de ensino fundamental, do tema doença de Chagas nas atividades curriculares e extracurriculares, para escolares residentes em área rural, visando o repasse da orientação aos pais com vistas ao encaminhamento de insetos à unidade básica de saúde (UBS) ou ao Posto de Identificação de Triatomíneos (PIT) mais próximo.

## 1.2. Triatomíneos

Os insetos da subfamília Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) conhecidos vulgarmente como barbeiros, são também chamados de chupões, chupanças, bicudos, finções ou procotós, sendo muito conhecidos das populações rurais de várias regiões do Brasil, constituindo um grupo amplamente distribuído pela região Neotropical, possuindo 144 espécies descritas (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO *et al.* 2003; SCHOFIELD & GALVÃO, 2009; POINAR, 2005; FRIAS-LASSERRE, 2010; ROSA *et al.* 2012). Essas 144 espécies estão agrupadas em 18 gêneros e seis tribos. O gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 80 espécies, as quais estão agrupadas em oito complexos (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).



A maior incidência de triatomíneos ocorre no continente americano, com maior concentração na América Latina, e apenas 13 espécies, foram assinaladas fora do continente americano (JURBERG, 1996). Apesar do grande número de espécies existentes, apenas algumas participam ativamente da transmissão da infecção ao homem, de acordo com o habitat ocupado.

No Brasil existem 69 espécies da subfamília Triatominae (CARANHA *et al.* 2011) e as espécies conhecidas como principais transmissoras da doença de Chagas são: *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *Triatoma sordida* (Stål, 1859) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), encontradas também no habitat silvestre, porém adaptadas ao domicílio. Outras espécies tidas como silvestres em nosso país, tais como *Rhodnius neglectus* Lent (1954) e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), vêm merecendo atenção por serem capturadas com frequência no domicílio (SILVEIRA, 1995; ALMEIDA *et al.* 2000; RODRIGUES *et al.* 2005) e *Rhodnius brethesi* Matta, 1919, que vem atacando os colhedores de piaçava no Município de Barcelos, Estado do Amazonas, participando ativamente da transmissão vetorial da doença (COURA *et al.* 1994).

O primeiro relato sobre a aparência e os hábitos de um triatomíneo data de 1590 e foi feito por Reginaldo de Lizárraga que em viagens de inspeção a conventos do Peru e Chile, notou a presença de grandes insetos hematófagos que atacavam durante a noite. Diversos outros viajantes e naturalistas também citaram a presença desses insetos na América do Sul. Um dos mais célebres relatos deve-se a Charles Darwin, durante sua viagem pela América do Sul a bordo do H.M.S. (FIOCRUZ, 2012).

As espécies de triatomíneos apresentam relevante importância epidemiológica devido à necessidade de exercerem o hematofagismo obrigatório em todas as fases da vida sobre os vertebrados, fator determinante da proximidade dos triatomíneos com mamíferos silvestres e/ou homem. Este comportamento e a uniformidade fisiológica desses insetos favorecem a transmissão do agente etiológico, *T. cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas (LENT & WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD & DOLLING, 1994, JURBERG *et al.* 2004), tanto pela transmissão oral quanto pela transmissão vetorial. Embora todas as espécies de triatomíneos sejam vetores em potencial deste protozoário, apenas aquelas que colonizam o domicílio e ou peridomicílio, são epidemiologicamente importantes.

Os triatomíneos foram reconhecidos no Rio Grande do Sul (RS) a partir do início do século 20 (LENT, 1942). NEIVA (1913) fez o primeiro registro de *T. infestans*, enquanto LUTZ *et al.* (1918) fizeram uma das primeiras avaliações de distribuição geográfica. OLIVEIRA (1920) registrou *P. megistus* e mais tarde NEIVA & PINTO (1922) registraram *T. sordida* no estado. NEIVA & PINTO (1923) descreveram *Triatoma gomesi*, mais tarde sinonimizado como *T. rubrovaria* por LENT (1942). NEIVA *et al.* (1939) descreveram *Triatoma oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939). Posteriormente LENT (1942) descreveu *Panstrongylus tupyambai* Lent, 1942 e fez o primeiro registro de *T. rubrovaria*. PINTO (1942) e COUTINHO *et al.* (1952) atualizaram a distribuição geográfica regional e as prevalências para a infecção por *T. cruzi*, causador da doença de Chagas, e posteriormente DI PRIMIO (1957) fez o primeiro registro de *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859). SILVEIRA *et al.* (1984) realizaram um estudo da distribuição geográfica por município das espécies capturadas pela Fundação Nacional de Saúde (FNS) entre 1975-1983 e mais tarde SALVATELLA *et al.* (1991, 1993) registraram *Triatoma platensis* Neiva, 1913 e *Triatoma delpontei* Romaña & Abalos, 1947. Finalmente JURBERG *et al.* (1998) e CARCAVALLO *et al.* (2001) descreveram *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha e Lent, 1998 e *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg & Galvão, 2001, respectivamente.

Segundo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012), *T. infestans* era considerada a espécie sinantrópica mais amplamente distribuída dentre os triatomíneos americanos e a principal espécie vetora da doença de Chagas na América do Sul (NOIREAU *et al.*, 1996; MONTEIRO *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.* 2008), responsável por 80% dos casos de transmissão vetorial no Brasil. No Rio Grande do Sul, o programa de controle de Doença de Chagas existe desde 1975 e o estado recebeu em 2005 a certificação de área livre de transmissão por *T. infestans* intradomiciliar, porém há ainda regiões que são consideradas de risco e a vigilância deve ser permanente.

Após a eliminação do *T. infestans* do domicílio no estado do RS, o estudo dos triatomíneos silvestres vem se tornando cada vez mais relevante e tem contribuído para o conhecimento dos seus ecótopos naturais, da sua associação com hospedeiros vertebrados, do mecanismo de interação entre o ecótopo artificial e natural, possibilitando também o esclarecimento dos principais mecanismos da transmissão de *T. cruzi* dos focos naturais para os ecótopos artificiais, e do eventual estabelecimento ou restabelecimento do ciclo doméstico de transmissão, o que têm contribuído para o estudo da dinâmica populacional desses insetos (OPAS, 2012).

Em Triatominae, as mudanças morfológicas podem ser observadas e associadas com a adaptação a diferentes tipos de habitats. Essas mudanças envolvem simplificações na redução do tamanho do corpo, no grau de dimorfismo sexual e na relaxação da simetria bilateral (SCHOFIELD, 1994; SCHOFIELD *et al.*, 1999; DUJARDIN *et al.*, 1997a,b, 1998, 1999a,b, 2000). Considerando o laboratório um novo habitat para um triatomíneo, essas mudanças podem ser observadas também especialmente referidas à redução do tamanho e volume de sangue ingerido durante o repasto (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1976), e em alguns casos, até no tamanho das asas, músculo torácico e capacidade de dispersão através do vôo (SOARES, 1997; JARAMILLO *et al.*, 2002). Essas reduções, segundo DUJARDIN (1998) podem ser causadas pelo alto número de indivíduos mantidos nas colônias de laboratório e a conseguinte disputa pela alimentação que tornar-se-ia maior e como consequência, os insetos fariam uma menor ingestão, o que proporcionaria uma nutrição deficiente.

Os vários estudos sobre a distribuição de triatomíneos no Brasil têm levado em conta a capacidade de domiciliação, critério pelo qual as espécies são classificadas em três grupos essenciais, as domiciliadas, as peridomiciliadas e as silvestres (ZELEDÓN, 1976). Considerando-se aquelas pertencentes às duas primeiras dessas categorias, alguns autores procuraram estudar a sua distribuição e dispersão, associando-as a condições climáticas e a aspectos biogeográficos, estes relacionados principalmente à natureza da cobertura vegetal (ARAGÃO & DIAS, 1956; BUSTAMANTE, 1957; SEREBRENICK, 1959; LUCENA, 1959; SHERLOCK & SERAFIM, 1972).

O estudo dos triatomíneos em ambiente natural vem contribuindo para a aquisição de conhecimentos acerca dos mecanismos de dispersão desses triatomíneos, bem como para mapeamento das áreas de superposição destas em ambiente natural e também conhecer as distâncias geográficas existentes entre as populações intra-específicas na área de distribuição das espécies (VAZQUEZ-PROKOPEC *et al.*, 2005).

As populações de triatomíneos focalizadas com maiores detalhes são as que apresentam hábitos domiciliados, ou seja, com capacidade de colonização no domicílio e no peridomicílio, o que se reveste de maior importância epidemiológica.

### 1.2.1. “Complexo infestans”

Alguns grupos apresentam tão grande similaridade morfológica que para diagnose específica são necessárias técnicas taxonômicas mais sofisticadas para caracterizar um táxon (SCHOFIELD, 1988; BARATA *et al.* 1998; CARCAVALLO *et al.* 2001; JURBERG, 2003). Esses grupos, por praticidade, são agrupados em “complexos específicos”, porém não constituem uma categoria do Código Internacional de Nomenclatura (CARCAVALLO *et al.* 2001).

O conceito de “complexo específico” para Triatominae foi desenvolvido por USINGER *et al.*, (1966). Posteriormente, LENT & WYGODZINSKY (1979) reconheceram a existência de vários complexos no gênero *Triatoma*.

Recentemente, SCHOFIELD & GALVÃO (2009) redefiniram os complexos do gênero *Triatoma*, dividindo-os ainda, em subcomplexos. O “complexo infestans” atualmente compreende seis subcomplexos: *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. matogrossensis*, *T. rubrovaria*, *T. sordida*.

Os subcomplexos de espécies proximamente relacionadas podem incluir vetores com diferentes capacidades, portanto com importâncias epidemiológicas distintas. A caracterização de cada uma das espécies, com a utilização de diferentes abordagens que permitam conhecer com mais profundidade o grupo é o primeiro passo para a determinação de sua importância como vetor em sua área de ocorrência.

### 1.2.2. “Subcomplexo rubrovaria”

O “subcomplexo rubrovaria” é, atualmente, composto por seis subcomplexos: *T. carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai* e *T. rubrovaria*, das quais pouco se conhece acerca da ecologia. Entretanto, são frequentemente encontradas em ambientes peridomiciliar e domiciliar na região sul brasileira (ALMEIDA *et al.* 2009; COSTA & LORENZO, 2009; SANTOS *et al.* 2009), o que funciona como alerta para seu potencial papel como vetor no ciclo antropozoonótico da doença.

#### 1.2.2.1. Posição sistemática das espécies brasileiras do “subcomplexo rubrovaria”

Reino: Animal

Filo: Arthropoda

Subfilo: Atelocerata

Classe: Insecta

Ordem: Hemiptera

Subordem: Heteroptera

Superfamília: Reduvidae

Família: Reduviidae

Subfamília: Triatominae

Tribo: Triatomini

Gênero: *Triatoma*

Espécies: *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent, 1998

*Triatoma circummaculata* (Stål, 1859)

*Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)

### 1.2.2.2. *Triatoma rubrovaria*

*Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843) (Fig. 1) é uma espécie silvestre que invade o domicílio humano devido às mudanças ambientais produzidas por atividades antrópicas aliadas à eliminação de *T. infestans* do domicílio, o que deixou um nicho vazio e disponível (SALVATELLA *et al.*, 1995; OSCHEROV *et al.*, 2004).

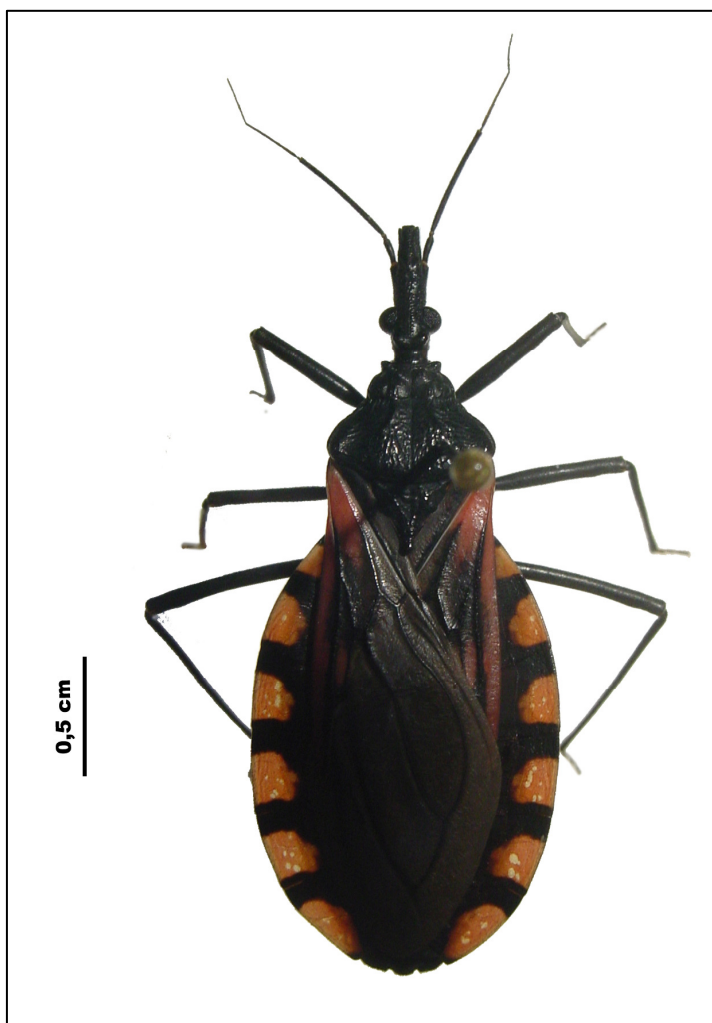


Figura 1: *Triatoma rubrovaria*

LENT (1942) mencionou que *T. rubrovaria* era encontrada exclusivamente em habitats peridomésticos e pedregosos no Rio Grande do Sul, mas raramente encontrado em habitações humanas. Posteriormente, alguns autores mencionaram o encontro desta espécie em habitats domésticos, mas com nenhuma indicação de colonização nos intradomicílios (CORREA, 1968; LENT & WYGODZINSKY, 1979; ALMEIDA *et al.*, 2000). SILVA (1985) e PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1988) afirmaram a importância de *T. rubrovaria* quanto à veiculação de *T. cruzi* ao homem. SILVEIRA & REZENDE (1994) reconheceram a potencialidade desta espécie em colonizar habitações humanas. SALVATELLA *et al.* (1994) evidenciaram que esta espécie se alimenta em humanos e SILVA & SILVA (1993) demonstraram que é um vetor altamente competente de *T. cruzi*. ROSA (1995) destacou o número elevado de exemplares desse triatomíneo em coletas realizadas no Rio Grande do Sul, assim como

a presença em residências das áreas rurais próximas ao ecótopo silvestre, o que confirma a importância epidemiológica desta espécie. Esta espécie, gradualmente vem se adaptando ao peridomicílio, colonizando o intradomicílio e transformando-se em um importante vetor secundário (SALVATELLA *et al.*, 1994).

Segundo LENT & WYGODZINSKY (1979), a distribuição geográfica de *T. rubrovaria* no Brasil estava relacionada aos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul, entretanto, de acordo com ROSA (1995) e ROSA *et al.*, (2000), esta distribuição restringe-se à área endêmica da doença de Chagas no Rio Grande do Sul. Já GURGEL-GONÇALVES *et al.*, (2012) mencionaram que *T. rubrovaria* encontra-se restrita ao Bioma Pampa. Todavia DIAS *et al.*, (2002) e MENEGUETTI *et al.*, (2011) destacam um registro isolado de *T. rubrovaria* em Rondônia. Esses triatomíneos alimentam-se de uma variedade de hospedeiros, incluindo o homem, demonstrando rapidez na obtenção do alimento e na primeira defecação, características que indicam esta espécie como um vetor eficaz na transmissão da doença de Chagas (BAR *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.* 2003).

Segundo ALMEIDA *et al.*, (2002), em relação às características biológicas de *T. rubrovaria*, é importante manter a vigilância epidemiológica e realizar estudos em aspectos bionômicos da potencialidade do vetor.

### 1.2.2.3. *Triatoma carcavallo*

*Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 (Fig. 2) foi descrita com base em quatro fêmeas coletadas no intradomicílio, atraídas pela luz, em diferentes localidades, como Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão e Dom Feliciano, municípios do estado do Rio Grande do Sul.

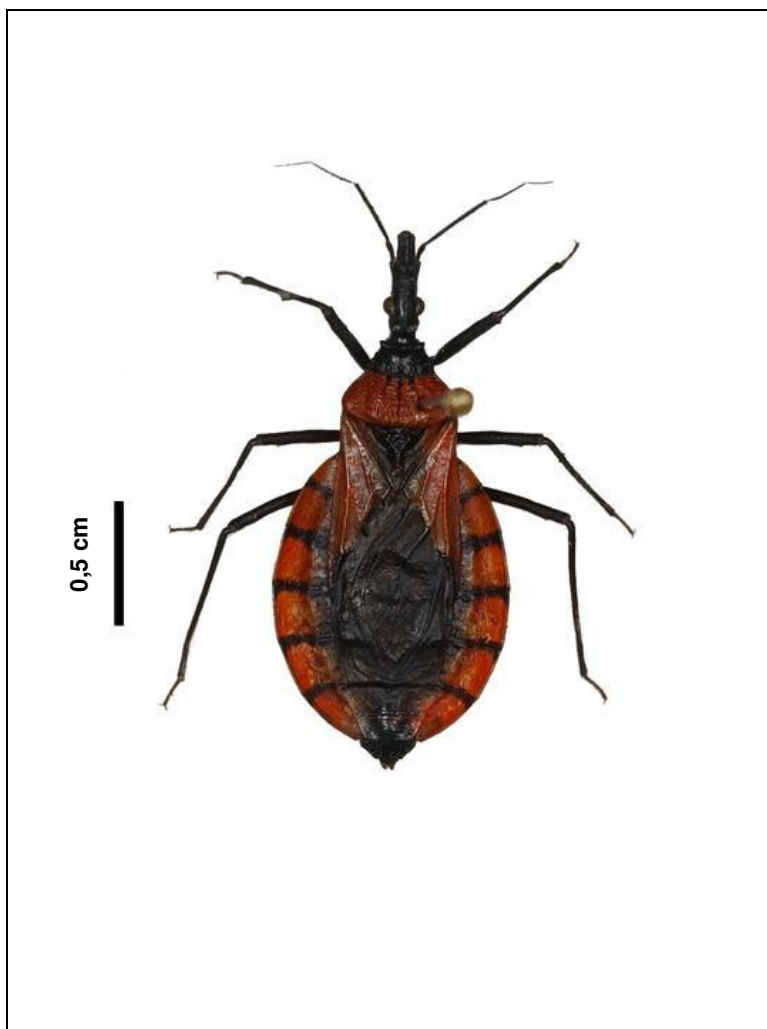


Figura 2: *Triatoma carcavallo*

Espécie silvestre, com distribuição geográfica restrita ao Estado do Rio Grande do Sul, é encontrada em simpatria com *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, no peridomicílio e no intradomicílio (CARDOZO-DE-ALMEIDA, 2007).

Esta espécie foi considerada afim de *T. rubrovaria* (JURBERG *et al.*, 1998), entretanto distingui-se pelo intenso colorido laranja do lobo posterior do pronoto, do cório e do aspecto aguçado do ângulo anterior do pronoto, além das características morfológicas, do comprimento e da largura da cabeça, do rostro, do tamanho dos olhos, do abdômen e do gonocoxito do nono segmento. Esta espécie foi registrada no município de Encruzilhada do Sul, Rio Grande do Sul, sendo capturado um exemplar em estágio ninfal que atingiu o estágio adulto no laboratório (ALMEIDA *et al.*, 2002b).

RUAS-NETO & CORSEUIL (2002) observaram em seus estudos a isenção de infecção por *T. cruzi* em *T. carvalhoi* e a elevada taxa de infecção por um protozoário gregarínico, *Machadoella triatomae* Reichenow, 1935.

#### 1.2.2.4. *Triatoma circummaculata*

*Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) (Fig. 3) é a espécie mais importante depois de *T. infestans* no Uruguai. Sua distribuição geográfica no Brasil está restrita ao Rio Grande do Sul. Na literatura, esta é a segunda espécie silvestre mais capturada nesse estado e ocupa ecótopos semelhantes a *T. rubrovaria* e por vezes podem ser encontradas juntas (LENT & WYGODZINSKY, 1979; ROSA *et al.*, 2000).

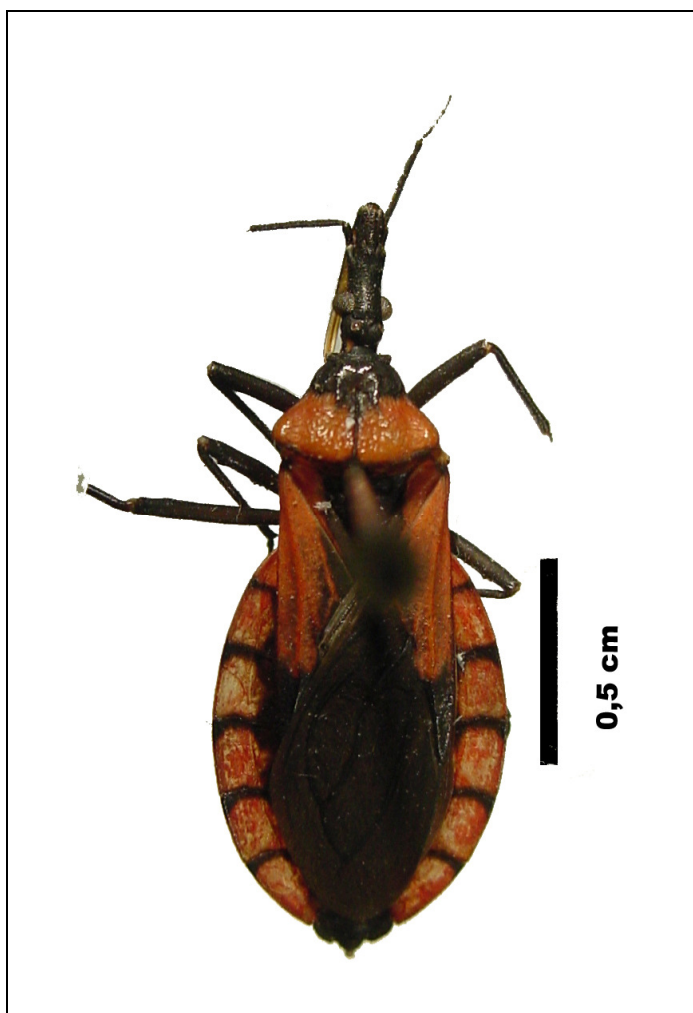


Figura 3: *Triatoma circummaculata*

RUAS-NETO & CORSEUIL (2002) encontraram *T. circummaculata* vivendo em simpatria com *T. carvalhoi* e com *T. rubrovaria*.

Estudos filogenéticos com *T. circummaculata* baseados nas seqüências do DNA mitocondrial incluíram-na no complexo *T. infestans* embora estivesse em desacordo com a classificação morfológica (GARCIA *et al.* 2001). SAINZ *et al.* (2004) também analisaram seqüências de DNA mitocondrial de *T. circummaculata* e confirmaram a inclusão desta espécie, como um membro do “subcomplexo rubrovaria” dentro do “complexo infestans”.



### 1.3. Morfologia dos Triatomíneos

Segundo PAPAVERO & MARTINS (1994), a diagnose ou diagnose diferencial é uma breve enumeração dos caracteres ou combinações de caracteres mais importantes, peculiares a uma dada espécie, e pelo qual esta difere de outras espécies semelhantes ou relacionadas.

A diagnose da subfamília Triatominae vem sendo estudada ao longo do tempo, por inúmeros parâmetros, principalmente aqueles relacionados aos caracteres morfológicos externos e aspectos cromáticos que se utilizam da microscopia ótica para suas análises, aliados a distribuição geográfica (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Os estudos realizados por PINTO (1931) através da microscopia ótica revelaram a importância do rostro na caracterização dos gêneros da subfamília Triatominae, considerando que a relação entre os artigos desta estrutura nos hemípteros em geral, especialmente nas famílias hematófagas é importante para a sistemática destes insetos. LENT & WYGODZINSKY (1979) indicaram a importância taxonômica do sulco estridulatório, o qual varia na forma, no comprimento, número e no espaço dos sulcos.

Até a década de '60, a taxonomia dos triatomíneos usava como critérios básicos, os caracteres morfológicos externos e cromáticos, mas durante a última década, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) vem sendo usada como uma ferramenta importante para a sistemática de Triatominae, justificando o status de espécies crípticas e seus complexos (SILVA *et al.*, 2003). Segundo CARCAVALLO *et al.* (1998), a MEV é a principal ferramenta usada para estudar 97 de 110 espécies de Triatominae.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) auxilia na investigação e na análise de estruturas como, diversas cerdas, textura de tegumento, presença de poros, dentre outras, não visíveis através da microscopia ótica, que permitem a diferenciação das espécies. Com a utilização desta técnica, detalhes de algumas estruturas da anatomia externa dos triatomíneos vêm sendo descritos com a finalidade de auxiliar no esclarecimento do status de espécies crípticas (CARCAVALLO *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 1999, 2000, 2002, 2003, JURBERG *et al.*, 2002). O estudo das estruturas externas permite verificar padrões morfológicos que proporcionem o correto diagnóstico das espécies.

À medida que o conceito específico vem se ampliando, tornou-se necessário adicionar estudos morfométricos na análise da forma como uma importante ferramenta nos estudos dos artrópodos (HUTCHESON *et al.*, 1995; ANEZ *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000). A morfometria é uma técnica extremamente sensível e por esta razão é necessário parcimônia com o tamanho das amostras utilizadas, uma vez que estas podem gerar erros de leitura (SANTOS *et al.*, 2003).

A morfometria no intuito de explicar as variações do tamanho e conformação dos indivíduos interpopulacionais vem sendo de extrema importância para a compreensão do comportamento de invasão de dependências humanas por determinadas populações de triatomíneos (MATIAS, 2001; SCHACHTER-BROIDER *et al.*, 2004; GUMIEL, 2008).

As campanhas de controle precisam ser intensificadas devido à invasão de espécies silvestres em ambientes de ações antrópicas e sua domiciliação. Neste sentido, BARATA (1998) mencionou que enquanto o vetor primário é eliminado, torna-se necessário continuar o estudo destes insetos, em especial aqueles estágios relativamente pouco conhecidos entre os quais se encontram os ovos.

Complementar ao estudo dos insetos adultos e das ninfas, destaca-se a importância dos trabalhos sobre ovos de Triatominae, comprovada na literatura (GALLIARD, 1936; LENT & WYGODZINSKY, 1979; BARATA, 1981;

GONÇALVES *et al.*, 1985; JURBERG *et al.*, 1986, 2002; COSTA *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2000) e têm corroborado principalmente para a distinção genérica ou específica.

#### 1.4. Biologia dos Triatomíneos

O conhecimento de aspectos da biologia de espécies silvestres é de grande importância para a avaliação da eficiência destes insetos como vetores de *T. cruzi*. O ciclo de vida dos triatomíneos varia de acordo com a espécie e condições ambientais onde vivem e é fortemente influenciado pela disponibilidade de fontes sanguíneas adequadas (SCHOFIELD, 1985; ROCHA *et al.*, 2004; CARBAJAL DE LA FUENTE *et al.*, 2010).

O período de desenvolvimento ninfal dos triatomíneos está relacionado às condições de alimentação, temperatura e umidade a que são submetidos. A maioria dos estudos sobre o ciclo de vida da subfamília Triatominae foi realizada sob circunstâncias controladas de temperatura e de umidade relativa, embora estes fatores mostrassem variações diárias e sazonais em habitats naturais (LUZ *et al.*, 1999). Entretanto, o comportamento das espécies que possuem hábitos silvestres pode ser alterado por modificações em seus habitats.

A interferência de fatores climáticos na distribuição e dispersão das espécies de triatomíneos foi estudada por CURTO DE CASAS *et al.*, (1999), que analisaram várias espécies, tentando estabelecer relações entre as diferentes temperaturas e o período de desenvolvimento. As conseqüências do aumento de temperatura associada à baixa umidade relativa podem acarretar redução acentuada no desenvolvimento ninfal e aumento da freqüência de repastos sanguíneos como forma de compensar a perda de água.

As prováveis alterações na biologia dos insetos vetores são: alterações no mecanismo de dispersão pelo vôo; aumento do número de repastos e, conseqüentemente, a probabilidade de infecção/transmissão; aceleração do ciclo biológico e crescimento populacional (ROCHA *et al.*, 2004).

A eficácia das campanhas de controle da doença de Chagas diante de seus vetores é afetada pela resistência ao jejum, uma vez que os insetos podem continuar em seus abrigos, como nas fendas das paredes, que são inacessíveis à ação dos inseticidas ou seus possíveis efeitos residuais, aumentando as possibilidades de uma possível recolonização por esses vetores nos domicílios (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1969; CORTÉZ & GONÇALVES, 1998; MOREIRA & SPATA, 2002).

De acordo com OSCHEROV *et al.*, (2005) é essencial o conhecimento das características biológicas dos insetos para designar as estratégias de controle, principalmente nos vetores secundários com potencial para se estabelecer em habitações humanas.

## 1.5. O sequenciamento de DNA na caracterização dos Triatomíneos

Uma sequência de DNA ou sequência genética é uma série de letras representando a estrutura primária de uma molécula ou cadeia de DNA, real ou hipotética, com a capacidade de carregar informação.

As letras possíveis são *A*, *C*, *G* e *T*, representando os quatro nucleotídeos (subunidades) de uma cadeia de DNA – as bases adenina, citosina, guanina, timina, covalentemente ligadas a uma "coluna vertebral" de fósforo. Tipicamente, as sequências são impressas uma ao lado da outra, sem espaços, como na sequência AAAGTCTGAC, de 5 a 3, indo da esquerda para a direita. Uma sucessão de quaisquer nucleotídeos maior que quatro está apta a ser considerada uma sequência. Com respeito à sua função biológica, a qual pode depender do contexto, uma sequência pode ou não "fazer sentido", e também ser codificável ou não-codificável. Sequências de DNA também podem conter "DNA lixo". As sequências podem ser obtidas de material biológico através de um processo denominado sequenciamento de DNA.

O sequenciamento de DNA mitocondrial, que é herdado matematicamente, não sofre recombinação e apresenta uma taxa de evolução de até 10 vezes maior que o DNA nuclear, transformando-se numa excelente técnica para a separação de espécies crípticas e estudos de filogenia de triatomíneos bem como para estudos filogeográficos e de genética populacional. Os marcadores do mtDNA mais utilizados no estudo da filogenia de triatomíneos são os fragmentos que originam as subunidades ribossomais 12S e 16S, citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (Cytb) para as quais já foram depositadas um grande número de sequências no banco de dados de DNA – GenBank (GARCIA & POWELL, 1998; SAINZ *et al.* 2004; ALMEIDA *et al.* 2009; TEVES-NEVES, 2012).

O sequenciamento de fragmentos de genes permite a avaliação direta de polimorfismos de DNA, fornecendo o melhor tipo de dado para inferências filogenéticas e determinação de relações de parentesco entre indivíduos e populações. Diferentes segmentos de DNA mitocondrial (mt) e nuclear evoluem a taxas diferentes.

Dados de seqüências mitocondriais têm sido usados para resolver questões taxonômicas. O *status* específico de muitos táxons problemáticos foi confirmado, enquanto espécies reconhecidas revelaram-se apenas variantes cromáticas. Em muitos casos, as análises revelaram que uma única espécie era de fato composta de mais de um táxon críptico (FIOCRUZ, 2012).

Diante do exposto, objetivamos neste estudo realizar uma caracterização comparativa entre as três espécies brasileiras do “complexo infestans”, “subcomplexo rubrovaria” utilizando diferentes abordagens biológicas, moleculares, morfológicas e morfométricas. Pretendemos abordar mais especificamente, os seguintes itens:

- Descrever a morfologia externa de *Triatoma carcavallo* através da microscopia ótica e eletrônica de varredura;
- Explicar as relações fenotípicas e filogenéticas entre espécies brasileiras do “subcomplexo rubrovaria” coletadas nos domicílios do estado do Rio Grande do Sul;
- Analisar comparativamente os aspectos morfológicos e morfométricos dos exocórios dos corpos e opérculos dos ovos através da microscopia ótica e eletrônica de varredura a fim de evidenciar padrões distintos e estáveis das espécies brasileiras do “subcomplexo rubrovaria”;

- Comparar a búcua, rostro e sulco estridulatório de *Triatoma carcavalloii*, *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* através da microscopia eletrônica de varredura;
- Analisar e comparar o escutelo e a genitália feminina através da microscopia eletrônica de varredura de *T. carcavalloii*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*;
- Conhecer o aspecto bionômico de *Triatoma carcavalloii*.

## 2.0. CAPÍTULOS

Na presente tese, três espécies do gênero *Triatoma* pertencentes ao “complexo infestans”, “subcomplexo rubrovaria” foram estudadas. As espécies são endêmicas da Região Sul e vivem em simpatria: *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavallo* e *Triatoma circummaculata*. Utilizamos análises morfológicas, moleculares, morfométricas e biológicas no intuito de responder questões relacionadas ao agrupamento dessas no “complexo infestans” e mais intimamente no “subcomplexo rubrovaria”.

Apresentaremos os resultados sob a forma de capítulos:

### 2.1. Capítulo 1

**SANTOS-MALLET J, CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR, NOVO SC, GONÇALVES TCM 2008. Morfologia Externa de *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Através da Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura.**

***Entomobrasilis* 1(2): 37-42.**

# Morfologia Externa de *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Através da Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura

Jacenir Reis dos Santos-Mallet, Margareth Cardozo-de-Almeida, Shenja Corrêa Novo & Teresa Cristina Monte Gonçalves

Fundação Oswaldo Cruz, e-mail: [jacenir@ioc.fiocruz.br](mailto:jacenir@ioc.fiocruz.br) (Autora para correspondência), [marca@ioc.fiocruz.br](mailto:marca@ioc.fiocruz.br), [shenia@ioc.fiocruz.br](mailto:shenia@ioc.fiocruz.br) e [temonte@ioc.fiocruz.br](mailto:temonte@ioc.fiocruz.br)

*EntomoBrasilis* 1(2): 37-42 (2008)

**Resumo.** *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent é uma espécie com distribuição geográfica restrita ao Estado do Rio Grande do Sul, hábitos silvestres, vivendo em simpatria com *Triatoma rubrovaria* (Blanchard) e *Triatoma circummaculata* (Stal). Diferenças morfo-estruturais na região cefálica de adultos foram ilustradas. Na análise morfológica das antenas de *T. carcavallo* foi verificado em machos e fêmeas a ocorrência de 14 tricobótrias no terceiro e quarto segmento antenal. Na cabeça a presença de 1+1 manchas pós-ocelares. Nos fêmures das pernas de ambos os sexos foi encontrado um par muito pequeno de denticulos subapicais. As fossetas esponjosas foram encontradas somente nos machos, nas tíbias das pernas anteriores e medianas. O estudo do rostró é importante para a caracterização da subfamília Triatominae, assim como o sulco estridulatório e a búcua. A búcua possui borda grossa, superfície granular e forma de "U". O rostró é similar em ambos os sexos. A placa apical tem forma de diamante na lamela inferior e forma digitiforme na lamela superior. No ápice do rostró duas fendas laterais 1+1 foram observadas. O sulco estridulatório desta espécie tem a forma de "V" e é mais largo nas fêmeas do que nos machos. Esta é a primeira descrição morfológica destas estruturas em adultos de *T. carcavallo* usando a microscopia eletrônica de varredura. Estes resultados relacionados aos estudos morfológicos realizados em *T. carcavallo* evidenciam a importância destas estruturas para caracterização específica.

Palavras-chave: Búcua, pernas, região cefálica, rostró, sulco estridulatório.

## External Morphology of *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by Optical and Scanning Electron Microscopy

**Abstract.** *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent is specie with restricted geographic distribution to the State of Rio Grande do Sul, rupestral habits, living currently in sympatry with *Triatoma rubrovaria* (Blanchard) and *Triatoma circummaculata* (Stal). Morpho-structural differences in the cephalic region of the adults had also been illustrated. In the morphological analysis of the antennae of *T. carcavallo* it was verified the occurrence in both, male and females, more than 14 trichobotrium, in the third and fourth antennal articles. In the head the presence of 1+1 post-ocelares spots. In the legs, a pair of sub-apical denticles in femures of both male and female was found. Spongy fossette had been found only in the males, in the tibiae of the previous and medium legs. The study of rostrum is important to the characterization of the subfamily Triatominae, as well as the stridulatory sulcus and buccula. The buccula possess a thick edge, granular surface and "U" shape. The rostrum is similar in both sexes. The apical plate has a diamond shaped inferior lamella and the superior one has a digit form. In the apex of the rostrum two lateral rifts 1+1 are observed. The stridulatory sulcus of these specie is "V" shaped and is more larger in the females than in males. This is the first morphologic description of these structures in the adults of *T. carcavallo* using the scanning electronic microscopy. The results related to the morphological studies carried out in *T. carcavallo*, showed evidences that some structures are important for the specific characterization.

**Key words:** Buccula, cephalic region, legs, rostrum, stridulatory sulcus

Através da morfologia, a ciência tem conseguido agrupar os animais através de seus graus de semelhanças e/ou diferenças, inerentes a cada grupo específico. Entretanto, tais características têm deixado dúvidas quanto à identificação em nível de espécie, o que motivou o início da utilização de novos marcadores taxonômicos para a sua identificação. Em muitos casos tais diferenças morfológicas em determinadas espécies podem significar a existência de "complexos de espécies", formados por duas, três ou mais "espécies crípticas", que dificilmente são distinguíveis pelos recursos da taxonomia clássica e/ou morfológica (LENT & WYGODZINSKY 1979, BARATA 1981, GONÇALVES *et al.* 1985, COSTA *et al.* 1991).

A microscopia eletrônica de varredura tem demonstrado excelentes resultados, surgindo como uma metodologia de estudo complementar da taxonomia morfológica clássica, uma vez que estruturas não visíveis através da microscopia ótica como determinados tipos de cerdas, detalhes da estrutura do tegumento, poros, etc., estão enfim podendo ser contempladas por esta técnica. Adicionalmente através de programas acoplados aos microscópios, é possível realizar mensurações com grande precisão (AZEVEDO *et al.* 2004, ALENCAR *et al.* 2005, SANTOS-MALLET *et al.* 2005).

Na família Reduviidae (Hemiptera), a subfamília Triatominae é hematófaga e devido à uniformidade fisiológica todos os representantes são capazes de se infectar e/ou transmitir o *Trypanosoma cruzi* (Chagas), agente etiológico da doença de Chagas (JURBERG *et al.* 2004). Esta subfamília é composta

por 137 espécies (GALVÃO *et al.* 2003; COSTA & FÉLIX 2007), onde mais da metade delas já foram encontradas naturalmente infectadas por *T. cruzi*, além de dezenas de outras infectadas experimentalmente em laboratório (VINHAES & DIAS 2000). As espécies de triatomíneos têm ampla distribuição geográfica no Novo Mundo desde os Estados Unidos até o sul do Chile e Argentina. Estima-se que pouco mais de uma dezena ocorra fora do continente americano e estão associadas a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, com destaque para os mamíferos e pássaros (SCHOFIELD *et al.* 1999).

O principal vetor da doença de Chagas até o século passado era o *Triatoma infestans* (Klug). Hoje, no Brasil, esta espécie tem sua distribuição geográfica restrita a focos no Rio Grande do Sul e Bahia, e mesmo assim com baixa infestação e densidade (VINHAES 2001).

Dentre as espécies nativas, *Triatoma brasiliensis* Neiva e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espinola, são consideradas de risco para a transmissão da doença, pois são encontradas no habitat silvestre, podendo reinfestar o domicílio. Outras espécies, como *Panstrongylus lutzi* Neiva & Pinto, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard), *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent e *Triatoma circummaculata* (Stal) merecem atenção por serem capturadas com frequência no domicílio apresentando risco de transmissão do parasito. Estas três últimas são espécies com distribuição geográfica restrita ao Estado do Rio Grande do Sul - RS (ROSA 2000).

*T. carcavallo* foi descrita com base em quatro fêmeas



coletadas no intradomicílio, atraídas pela luz, nos Municípios de Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão e Dom Feliciano, municípios do Estado do Rio Grande do Sul (RS). Esta espécie vive em simpatria com *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* no peridomicílio e no intradomicílio, e foi considerada afim de *T. rubrovaria*. Distingue-se pelo intenso colorido laranja do lobo posterior do pronoto, do cório e do aspecto aguçado do ângulo anterior do pronoto, além das características morfológicas, (em relação às proporções,) do comprimento e da largura da cabeça, do rosto, do tamanho dos olhos, do abdômen menor, o que lhe confere um aspecto arredondado, e do gonocoxito do nono segmento. Após esta descrição esta espécie foi registrada no município de Encruzilhada do Sul (RS), sendo capturado um exemplar em estágio ninfal e atingindo o estágio adulto no laboratório (ALMEIDA *et al.* 2002).

RUAS-NETO & CORSEUIL (2002) observaram em seus estudos a isenção de infecção por *T. cruzi* em *T. carvalhoi* e a elevada taxa de infecção por um protozoário gregarínico, *Machadoella triatome* Reichenow, 1935.

O presente trabalho objetivou ampliar o conhecimento morfológico de *T. carvalhoi* para obter caracteres diagnósticos diferenciais, uma vez que esta é a primeira descrição morfológica do rosto, búcua e sulco estridulatório nos adultos desta espécie usando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção e manutenção dos insetos.** Foram utilizados exemplares machos e fêmeas de *T. carvalhoi*. A colônia foi iniciada com espécimes coletados no ecótopo natural e no peridomicílio, em dezembro de 2000 e outubro de 2005, no Estado do Rio Grande do Sul, em Encruzilhada do Sul (30°32'38"S; 52°31'19"O), localidade de Cordilheira (Figura 1). Os indivíduos foram mantidos em condições estáveis de temperatura e umidade, em estufa BOD a 29°C e 80% UR, com foto período de 12 horas no Setor de Morfologia, Ultraestrutura e Bioquímica de Artrópodes, do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. As criações permaneceram em frascos plásticos com tampas perfuradas, contendo internamente papel de filtro sanfonado com o objetivo de aumentar a superfície de contato e a possibilidade de refúgio, bem como reduzir o excesso de umidade.



Figura 1. Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Em destaque o município de Encruzilhada do Sul, local de coleta de *Triatoma carvalhoi*. Escala - 1:75000.

**Observações ao microscópio óptico.** Para observação das antenas, manchas pós-ocelares e pernas, cinco machos e cinco fêmeas foram dissecados. As estruturas montadas em lâminas, observadas em microscópio estereoscópico, modelo Stemi SV 11

(Zeiss) e posteriormente fotografadas no Laboratório de Imagens do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Observações ao microscópio eletrônico de varredura. Espécimes adultos, machos (n=5) e fêmeas (n=5), foram dissecados para a remoção das estruturas a serem analisadas: rosto, búcua e sulco estridulatório. Posteriormente, as estruturas foram fixadas a uma fita dupla-face aderida a um suporte metálico. Em seguida, foram pulverizados com ouro, em aparelho Balzers a alto vácuo, para serem observados e fotografados a 15 -20 KV, nos aumentos de 100X e 350X.

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura modelo JSM 5310 (Jeol), no Laboratório de Ultraestrutura Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo das estruturas externas permite verificar padrões morfológicos que proporcionem o correto diagnóstico das espécies. No presente trabalho utilizou-se a morfologia com o objetivo de ampliar o conhecimento de *T. carvalhoi*, o que é de suma importância para o desenvolvimento das ações de controle destes vetores.

Até a década de 1960, a taxonomia dos triatomíneos usava como critérios básicos, os caracteres morfológicos externos e cromáticos, observados através da microscopia óptica, aliados às informações da distribuição geográfica (LENT & WYGODZINSKY 1979).

Através da microscopia óptica, foram realizadas observações em exemplares machos e fêmeas de *T. carvalhoi* (Figura 2). Na análise morfológica das antenas verificou-se a ocorrência tanto em machos quanto em fêmeas de mais de 14 tricobótrias, no terceiro e quarto artículos antenais (Figuras 3A, 3B).

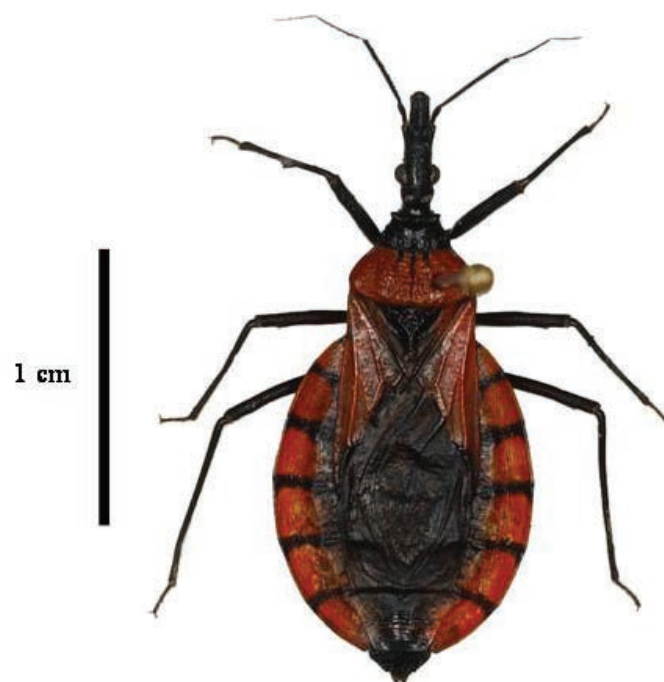


Figura 2. Espécime fêmea de *Triatoma carvalhoi*.

Na cabeça visualiza-se a presença de 1+1 manchas pós-ocelares (Figuras 4A, 4B). Nas pernas, foi encontrado um par de denticulos subapicais nos fêmures de ambos os sexos (Figura 5A a 5F). As fossetas esponjosas foram encontradas somente nos machos, nas tíbias das pernas anteriores (Figura 6A) e medianas (Figura 6C) estando ausentes nas fêmeas (Figura 6B, 6D) e nas tíbias das pernas posteriores de ambos (Figura 6E, 6F).

Os estudos realizados por PINTO (1931) com microscopia óptica revelaram a importância do rosto na caracterização dos gêneros da subfamília Triatominae, considerando que o



comprimento dos artículos desta estrutura nos hemípteros em geral, especialmente nas famílias hematófagas é importante para a sistemática destes insetos. Dados da literatura citam a importância além do rostro, da búcula e do sulco estridulatório, na análise destas estruturas presentes em grupos homogêneos de espécies.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem se mostrado uma importante ferramenta para uso na taxonomia, auxiliando na investigação e na análise de estruturas que permitem a diferenciação das espécies. Com a utilização desta técnica, detalhes de algumas áreas da anatomia externa dos triatomíneos vêm sendo descritos com a finalidade de auxiliar no esclarecimento do status de espécies crípticas (CARCAVALLO *et al.* 1998, SILVA *et al.* 1999, 2000, 2002, 2003, JURBERG *et al.* 2002).



Figura 3. Estruturas morfológicas de *Triatoma carvalhoi* observadas através da Microscopia óptica. A – Tricobótrias (seta) no terceiro e quarto artículos antenais de machos – 3X; B – Tricobótrias (seta) no terceiro e quarto artículos antenais de fêmeas – 3X.

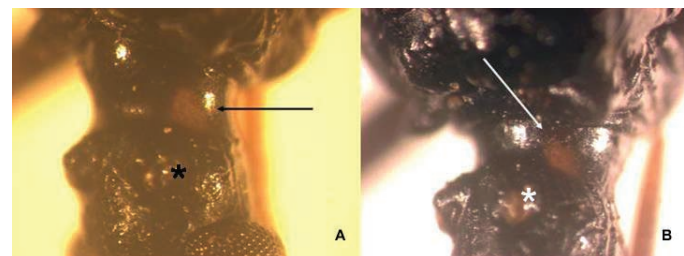


Figura 4. A - Manchas pós-ocelares no macho (\* = ocelo) - 6,3X; B - Manchas pós-ocelares na fêmea (\* = ocelo) - 6,3X.

Os resultados relacionados aos estudos morfológicos realizados em *T. carvalhoi* confirmam que estas estruturas são importantes para a caracterização específica. Os resultados obtidos através da microscopia eletrônica de varredura demonstram que a búcula dos exemplares desta espécie é em forma de “U” com uma borda grossa e superfície granular. A região anterior exhibe acentuadas pregas tanto nas fêmeas quanto nos machos (Figuras 7A e C; 8A). A região central apresenta uma fenda nas fêmeas (Figura 7B), caráter ausente nos machos (Figura 8B).

Em *Triatoma guazu* Lent & Wigodzinisky e *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, ambas pertencentes ao complexo oliverai, também foi observado por SILVA *et al.* (2003) o aspecto em forma de “U” da búcula, assim como em *Triatoma gerstaeckeri* (Stal) (FERRO *et al.* 1997). Já em *Rhodnius brethesi* Matta esta estrutura apresenta-se com uma forma ovalada, com uma constrição mediana, lembrando o formato de um número oito (SANTOS-MALLET *et al.* 2005).

Os resultados demonstram que o rostro de *T. carvalhoi* é similar nas fêmeas e nos machos (Figuras 9A e 9B), onde 1+1

fendas laterais foram observadas no ápice. Este, de formato losangular, apresenta uma lamela inferior e outra superior em forma de dígito. A placa apical apresenta-se mais rombuda nas fêmeas do que nos machos (Figuras 9C; 10 A e 10B).

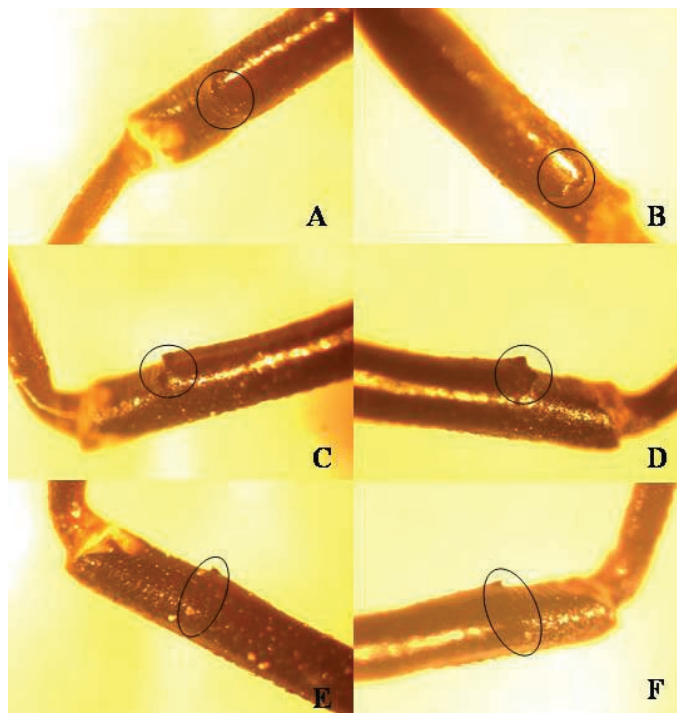


Figura 5. Denticulos subapicais nos fêmures de *Triatoma carvalhoi*, visualizados através da Microscopia óptica. A, C, E – machos, B, D, F – fêmeas.



Figura 6. Microscopia óptica de tíbias de *Triatoma carvalhoi* - 6,3X. Fosseta esponjosa na perna anterior, A - macho, B –fêmea; Fosseta esponjosa na perna mediana, C - macho, D – fêmea; Ausência de fosseta esponjosa na perna posterior, E - macho, F – fêmea.

Analisando o rostro de oito espécies do gênero *Triatoma*, CATALÁ (1996) conclui que o número e a distribuição das sensilas não diferem entre ninfas e adultos, diferindo, porém entre as diversas espécies de tritomíneos.

No presente trabalho o sulco estridulatório varia na



forma, no comprimento, número e no espaço dos sulcos. Em *T. carvalhoi* esta estrutura é em forma de “V” apresentando-se mais largo nas fêmeas do que nos machos (Figuras 11 e 12). Em *T. guazu* esta estrutura também apresenta o aspecto de “V” enquanto que em *T. jurbergi* foi observado o aspecto de “U” (SILVA *et al.* 2003). Observa-se em *T. carvalhoi* uma depressão em sua região central com estrias paralelas, sendo lateralmente delimitado em toda sua borda por papilas e sensilas.

É importante destacar que a descrição morfológica

da cabeça, antenas, búcula, rostro e sulco estridulatório de *T. carvalhoi* são inéditas na literatura, assim como a documentação por micrografias em microscopia eletrônica de varredura, enfatizando a importância destes dados na avaliação taxonômica.

Esses resultados ampliam o conhecimento sobre a morfologia de *T. carvalhoi* contribuindo para a identificação desta espécie e confirmam o valor taxonômico da búcula, do sulco estridulatório e do rostro para a taxonomia dos triatomíneos.

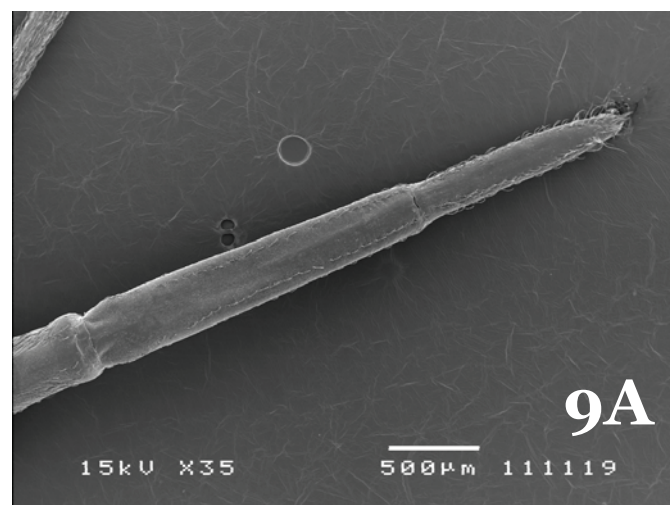
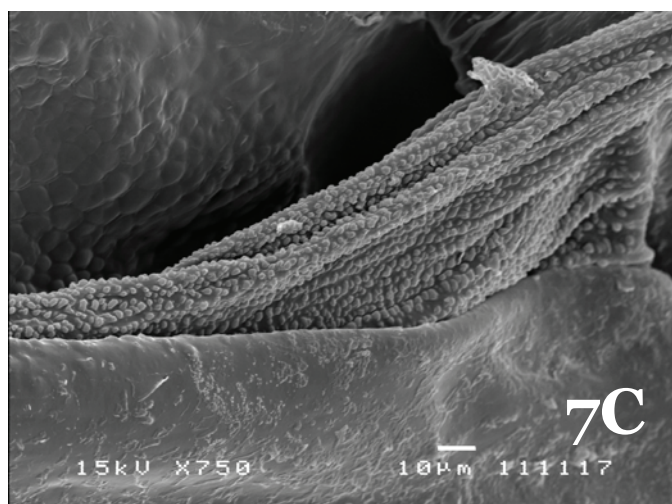
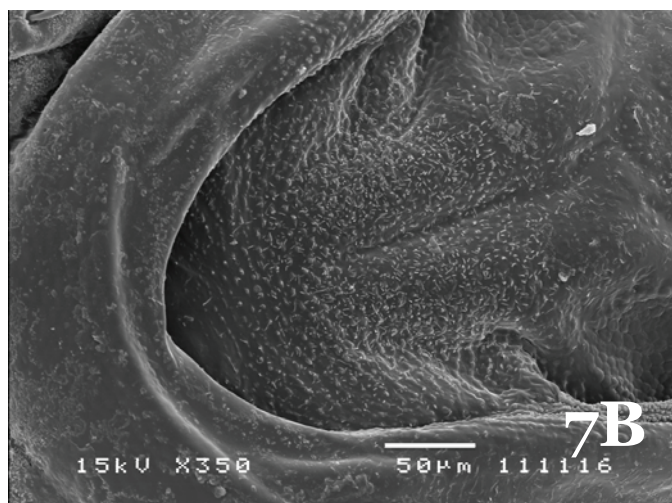
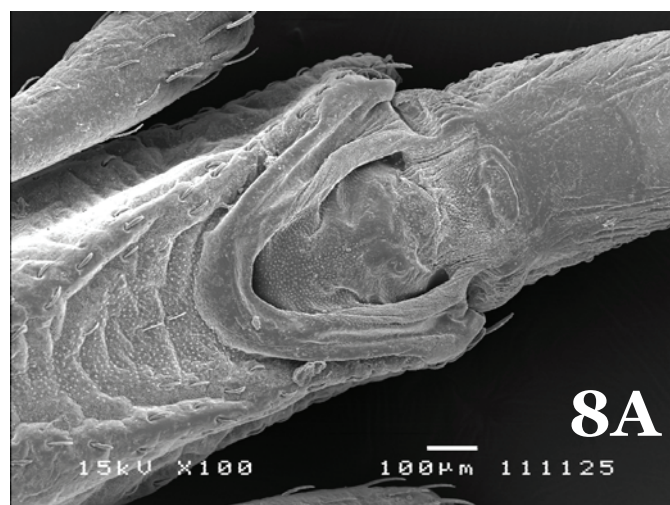


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura da cabeça de fêmea de *Triatoma carvalhoi* em vista ventral. A - Búcula em forma de “U”; B - Detalhe da búcula apresentando bordas grossas e uma fenda na depressão; C- Bordos laterais apresentando rugosidades.

Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da cabeça de machos de *Triatoma carvalhoi* em vista ventral. A - Búcula em forma de “U”; B - Detalhe da búcula apresentando bordas grossas e ausência de fenda.



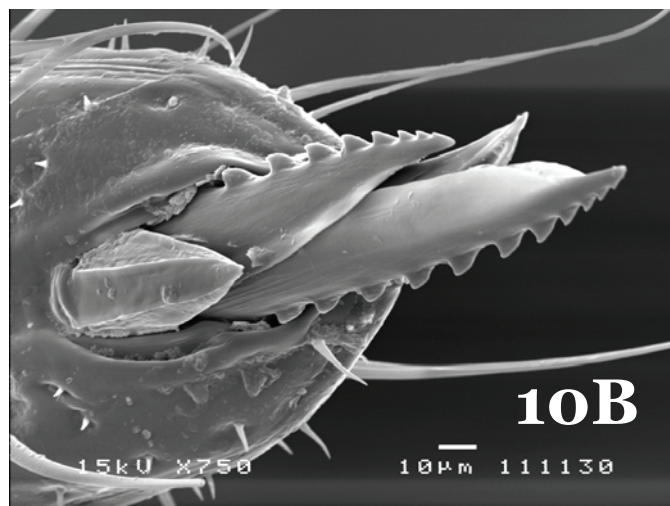
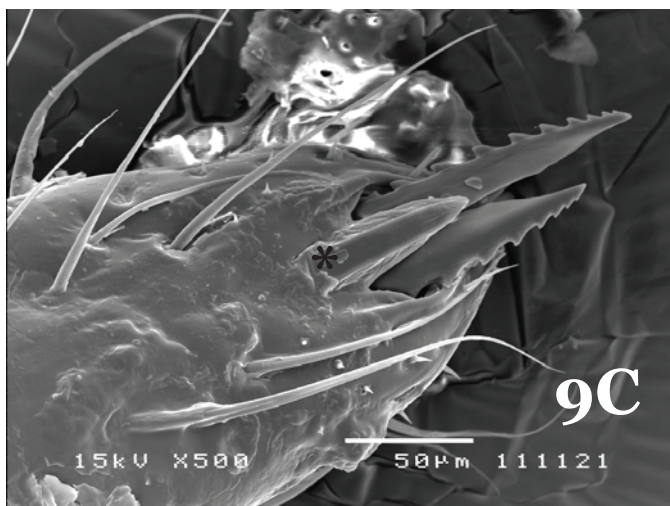
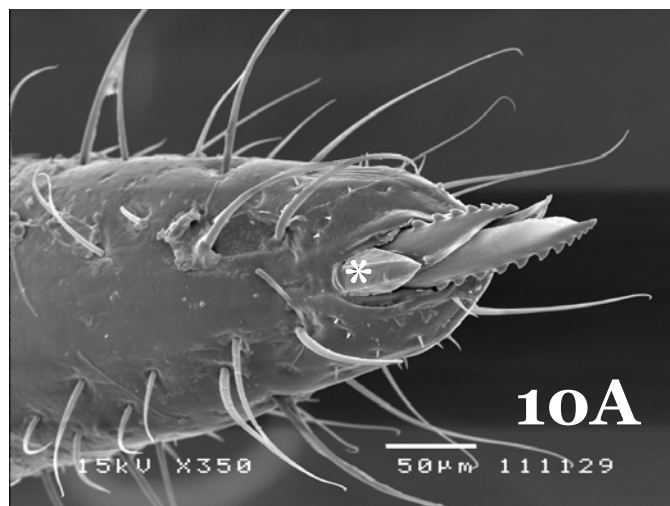
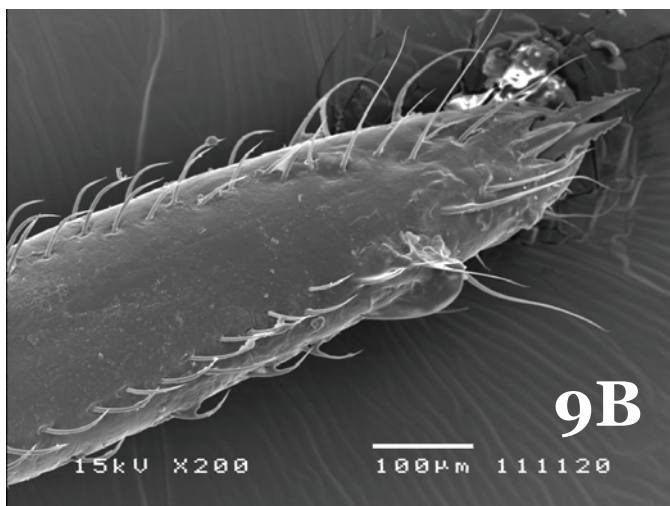


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura do rostro de fêmeas de *Triatoma carcaivalloi* em vista ventral. A – Vista geral; B – Primeiro segmento; C – Ápice do rostro com detalhe da placa apical (\*).

Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura do rostro de machos de *Triatoma carcaivalloi* em vista ventral. A – Primeiro segmento; B – Ápice do rostro com detalhe da placa apical (\*).

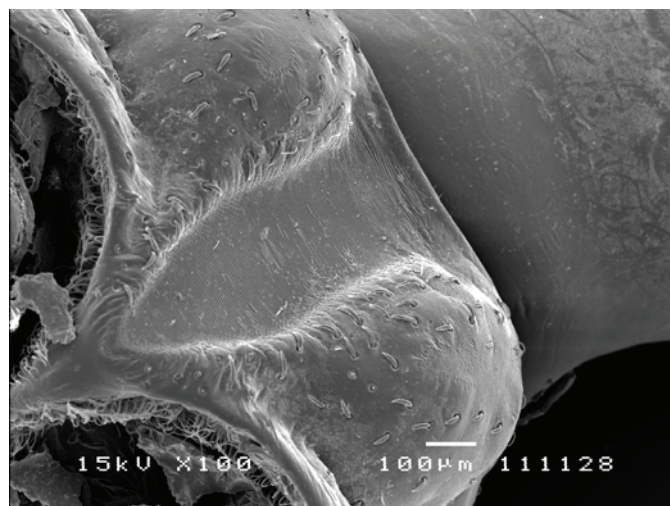
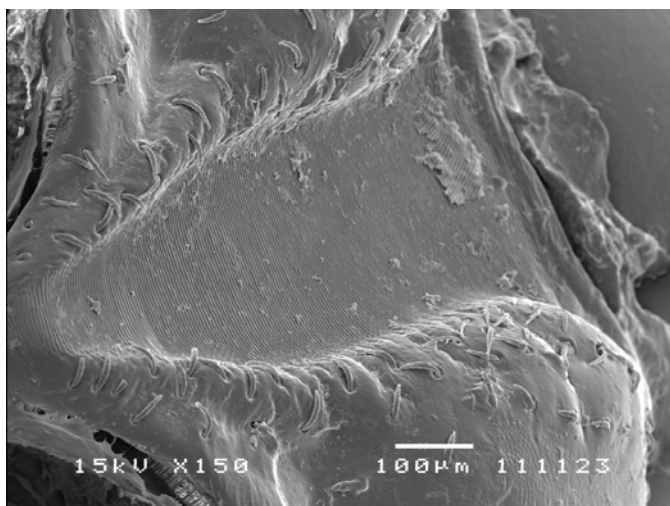


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura do proesterno e sulco estridulatório nas fêmeas de *Triatoma carcaivalloi*.

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura do proesterno e sulco estridulatório nos machos de *Triatoma carcaivalloi*.

**AGRADECIMENTOS**

Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol 5310. Ao Sr. Rodrigo Mexas do Setor de Processamento de Imagens do Instituto Oswaldo Cruz. À Sra. Ana Paula Rufino e Sr. Adalberto José da Silva do Setor de Morfologia, Ultraestrutura e Bioquímica – IOC/FIOCRUZ pelo apoio técnico.

**REFERÊNCIAS**

Alencar, J., A.E. Guimarães, R.P. Mello, C.M. Lopes, N. Degallier & J.R. Santos-Mallet, 2005. Scanning Electron Microscopy Study of the Egg of *Haemagogus* (*Haemagogus*) *capricornii* Lutz, 1904 (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 42: 1-6.

Almeida, C.E., R. Duarte, R.G. Nascimento, R.S. Pacheco & J. Costa, 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: Trophic resources and ecological observations of five populations collected in the

- state of Rio Grande do Sul. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97: 1127-1131.
- Azevedo, L.H.G., J.R. Santos-Mallet & M.M. Herzog, 2004. Caracteres Diagnósticos de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae). Neotropical Entomology, 33: 433-437.
- Barata, J.M.S., 1981. Aspectos morfológicos de ovos de Triatominae. II. Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). Revista de Saúde Pública de São Paulo, 15: 490-542.
- Carcavallo, R.U., C. Galvão & H. Lent, 1998. *Triatoma jurbergi* sp. n. do norte do estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) com uma atualização de sinonímias e outros táxons. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 93: 459-464.
- Catalá, S., 1996. Sensilla associated with the rostrum of eighth species of triatominae. Journal of Morphology, 228: 195-201.
- Costa, J. & M. Felix, 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102: 87-90.
- Costa, J., J. Jurberg & O.M. Barth, 1991. Estudos morfológicos de *Cavernicola lenti* Barret & Arias, 1985 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 86: 247-263.
- Ferro, Z.P.A., H.S. Barbosa, J. Jurberg & R.U. Carcavallo, 1997. The buccula and gula of Triatominae nymphs by scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae). Acta Microscópica, 6: 572-573.
- Galvão, C., R.U. Carcavallo, D.S. Rocha & J. Jurberg, 2003. A checklist of the current valid species of subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa, 202: 1-36.
- Gonçalves, T.C.M., J. Jurberg, J.M. Costa & W. Souza, 1985. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 80: 263-276.
- Jurberg J., M.B.A. Silva, C. Galvão, D.S. Roch, H.S. Barbosa & R. Carcavallo, 2002. Descrição dos ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 vistos através de microscopia óptica e eletrônica de varredura (Hemiptera, Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97: 209-216.
- Jurberg, J., C. Galvão, F. Noireau, R.U. Carcavallo, D.S. Rocha & H. Lent, 2004. Uma Iconografia dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae). Entomologia & Vectores, 11: 457-494.
- Lent H. & P. Wygodzinsky, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin American Museum Natural History, 163: 123-520.
- Pinto, C., 1931. Valor do rostrum e das antenas na caracterização dos triatomíneos. Boletim Biológico, 19: 45-137.
- Rosa, J.A., J.M. Barata, J.L.F Santos & M. Cilense, 2000. Morfologia dos ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Revista de Saúde Pública 34: 538-542.
- Ruas-Neto, A.L. & E. Corseuil, 2002. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Entomologia & Vectores, 9: 231-249.
- Santos-Mallet, J.R., A.C.V. Junqueira, C.J. Carvalho-Moreira, Z. Andrade, J.R. Coura & T.C.M. Gonçalves, 2005. Morphobiological aspects of *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) from the Upper and Middle Negro River, Amazon region of Brazil. I- Scanning electron microscopy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100: 915-923.
- Schofield, C.J., L. Diotaiuti & J.P. Dujardin, 1999. The process of domestication in Triatominae. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94: 375-378.
- Silva M.B.A., H.S. Barbos, R.U. Carcavallo, C. Galvão & J. Jurberg, 1999. Placas apicais do lábio das ninfas de 1º estágio de *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 e *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae), vetores da doença de chagas. Entomologia & Vectores, 6: 663-668.
- Silva, M.B.A., H.S. Barbosa, C. Galvão, J. Jurberg & R.U. Carcavallo, 2003. Comparative study of the stridulatory sulcus, buccula and rostrum of the nymphs of *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 and *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 by scanning electron microscopy (Hemiptera, Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98: 335-344.
- Silva, M.B.A., H.S. Barbosa, J. Jurberg, C. Galvão & R.U. Carcavallo, 2002. Comparative ultrastructural analysis of the antennae of *Triatoma guazu* and *Triatoma jurbergi* during the nymphal stage development (Hemiptera, Reduviidae). Journal of Medical Entomology, 39: 705-715.
- Silva, M.B.A., J. Jurberg, C. Galvão & R.U. Carcavallo, 2000. Estudo morfológico e morfométrico de ovos e ninfas de *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) vistos por microscopia óptica e eletrônica de varredura. Entomologia & Vectores, 7: 311-334.
- Vinhaes M.C. & J.C.P. Dias, 2000. Doença de Chagas no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 16: 7-12.
- Vinhaes, M.C., 2001. Grupo de Trabajo OPS en Enfermedad de Chagas, VIII. Os programas nacionais de controle na fase avançada de controle e os novos desafios estratégicos, políticos e epidemiológicos, p. 51-57. In: PAHO (Pan American Health Organization), Montevideo, Uruguay.

Recebido em: 21/07/2008

Aceito em: 23/07/2008

\*\*\*\*\*

#### Como citar este artigo:

Santos-Mallet, J.R., M. Cardozo-de-Almeida, S.C. Novo & T.C.M. Gonçalves Correo, 2008. Morfologia Externa de *Triatoma carcaivalloii* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Através da Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura. EntomoBrasilis, 1(2): 37-42. [www.periodico.ebras.bio.br/ojs](http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs)



## 2.1. Capítulo 2

**ALMEIDA CE, MARCET PL, GUMIEL M, TAKIYA DM, CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR, PACHECO RS, LOPES CM, DOTSON EM, COSTA J 2009. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil.**

***J Vect Ecology* 34(2): 164-173.**



## Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil

Carlos Eduardo Almeida<sup>1</sup>✉, Paula L. Marcet<sup>2</sup>, Marcia Gumiel<sup>1</sup>, Daniela Maeda Takiya<sup>3</sup>,  
Margareth Cardozo-de-Almeida<sup>4</sup>, Raquel S Pacheco<sup>5</sup>, Catarina Macedo Lopes<sup>4</sup>,  
Ellen M. Dotson<sup>2</sup>, and Jane Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biodiversidade Entomológica, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Av. Brasil 4365,  
21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Entomology Branch, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention,  
4770 Buford Highway, Chamblee, GA 30341-3717, U.S.A.

<sup>3</sup>Laboratório de Entomologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Caixa Postal 68044, 21941-971, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Setor de Morfologia, Ultraestrutura e Bioquímica de Artrópodes e Parasitos, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses,  
IOC/Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Sistemática Bioquímica, IOC/Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 12 August 2008; Accepted 30 April 2009

**ABSTRACT:** *Triatoma carcavallo* is considered a rare Chagas disease vector often collected inside domiciles in Rio Grande do Sul State. In this Brazilian state, *T. carcavallo* has been collected in the same ecotope (rock piles) with two other species (*T. rubrovaria* and *T. circummaculata*), with which it also shares morphological characteristics. Previous morphological studies placed *T. carcavallo* in the same species complex (“infestans complex”) and subcomplex (“rubrovaria subcomplex”) as *T. rubrovaria*, whereas *T. circummaculata* was placed in the “circummaculata complex.” The phylogeny of a group composed of 16 species of triatomines was reevaluated with the inclusion of *T. carcavallo* by Bayesian analysis using mtDNA sequences of subunits 12S and 16S of the ribosomal RNA, and the cytochrome oxidase I (COI) genes. The phenotypic relationship among *T. carcavallo* and related triatomines was also inferred from morphometrics. Phylogenetic results indicate that *T. carcavallo* is a sister species of *T. rubrovaria*, and both were recovered as closely related to *T. circummaculata*. Morphometric studies confirmed the closeness among *T. carcavallo*, *T. rubrovaria*, and *T. circummaculata*, prompting the placement of the latter species in the “infestans complex” and “rubrovaria subcomplex.” *Journal of Vector Ecology* 34 (2): 164-173. 2009.

**Keyword Index:** *Triatoma carcavallo*, mitochondrial DNA, morphometry, Chagas disease.

### INTRODUCTION

Chagas disease is caused by a flagellated protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, and is transmitted to humans mainly by blood-sucking triatomine true bugs. Approximately nine million Latin American people are at risk of contracting *T. cruzi* (Schofield et al. 2006). Vector transmission is still considered the main mode of infection in Brazil; therefore, most efforts against Chagas disease focus on the interruption of its natural vectorial transmission by controlling domiciliary vectors with pyrethroid insecticides. The National Health Foundation (Funasa) has employed intense insecticide spraying since the 1990s in Brazil directed at controlling *Triatoma infestans*, the triatomine responsible for most of Chagas disease cases in the past. The important accomplishment achieved by this program has been the interruption of *T. cruzi* transmission (Silveira and Vinhaes 1999, WHO 2002).

After the successful vector control program for *T. infestans*, triatomines formerly considered sylvatic have

begun threatening to transmit Chagas disease in several areas of Brazil. In the Rio Grande do Sul State (RGS), for example, data from the Chagas Disease Control Program indicated an increase in domiciliary and peridomiciliary invasion of *T. rubrovaria*. This species has become the most frequent triatomine species captured in this state (Almeida et al. 2000).

*Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha and Lent, 1998 is considered a rare species. Its description was based on six females captured by the technicians of the Brazilian Health Foundation in the municipalities of Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão, and Dom Feliciano in RGS. Since its description, little information has been provided regarding its phylogeny, ecology, vector competence, and bionomics. Almeida et al. (2002a) observed that three triatomine species (*T. carcavallo*, *T. rubrovaria*, and *T. circummaculata*; Figure 1) occur in sympatry in the same ecotope (rock piles) in RGS. All of them have also been found inside domiciles in this state (Martins et al. 2003, Jurberg et al. 1998). Jurberg et al. (1998) mentioned that *T. carcavallo*

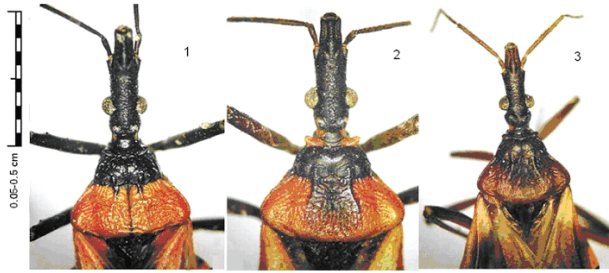


Figure 1. *Triatoma carcavalloi* (1), *T. rubrovaria* from Uruguay (2), and *T. circummaculata* (3).

exhibits an intermediate size between *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* and emphasized some particular characteristics used to distinguish *T. carcavalloi* from *T. rubrovaria* and *T. circummaculata*, such as the narrower anterior portion of pronotum and its smaller abdomen. Further diagnostic morphological characteristics of *T. carcavalloi* were provided by optical and scanning electron microscopy (Santos-Mallet et al. 2008), mainly regarding the number of trichobotria (more than 14) and the peculiar shape of the stridulatory sulcus and buccula.

Morphological observations led to the placement of *T. carcavalloi* in the same species complex (“infestans complex”) and subcomplex (“rubrovaria subcomplex”) of *T. rubrovaria*, whereas *T. circummaculata* was allocated into the “circummaculata complex.” This last species complex is composed of *T. circummaculata* and *T. limai*, and it does not present any subcomplex (Dujardin et al. 2002). Such classification of these species into these groups, however, did not agree with the phylogenetic analysis based on mitochondrial genes (12S and 16S ribosomal RNA, and the cytochrome oxidase I), where *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* appear as closely-related species (García and Powell 1998, García et al. 2001, Sainz et al. 2004). Additionally, these molecular analyses did not include *T. carcavalloi* as a result of its recent description (1998).

The phylogenetic placement of *T. carcavalloi* in relation to related species (*T. rubrovaria* and *T. circummaculata*) was herein studied based on DNA sequences and morphometry. Therefore, these two approaches were combined to address questions regarding the taxonomic and phylogenetic status of *T. carcavalloi* and its allies.

## MATERIALS AND METHODS

### Insects

Field specimens were used for all analyses. They were collected by manual, diurnal captures in the municipality of Encruzilhada do Sul, RGS, Brazil (30°32'38"S; 52°31'19"W; Figure 2) where savanna-like or steppe-like subtropical mixed prairies are the predominant vegetation type (IBAMA 2008). Hence, *T. carcavalloi* (n=1), *T. rubrovaria* (n= 17), and *T. circummaculata* (n=44) were collected in 1998 and 1999. Fifteen more specimens of *T. carcavalloi* were collected in 2002 in Encruzilhada do Sul, together with *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* specimens. During this fieldwork, *Triatoma circummaculata* was the most frequently collected (57%), followed by *T. rubrovaria* (29%), and finally *T. carcavalloi* (14%). These three species were collected in sympatry, moreover in the same ecotope: a sylvatic-like environment among rock piles where some of them were collected sharing the same shelter. These specimens of *T. carcavalloi* were collected in the same ecotope but in different collecting spots, distributed along a range of ~3km apart. Species were identified according to Lent and Wygodzinsky (1979) and Jurberg et al. (1998).

### Sequencing and phylogenetic analyses

Six samples of *T. carcavalloi* were randomly taken from the pool of field specimens and stored at -20° C until processed. DNA was purified with the Wizard Genomic



Figure 2. Grey squares mark the location where sympatric specimens of *T. carcavalloi*, *T. rubrovaria*, and *T. circummaculata* were captured in Rio Grande do Sul, Brazil, and the origin of specimens of *T. rubrovaria* from Uruguay of the Entomological Collection of Oswaldo Cruz Institute (Laranja's Collection).

Table 1. Primers used for amplification of gene regions used in phylogenetic reconstruction.

Gene	Primer	Publication source
12S-1	AT(G/A)AACAGTAATT(T/C)I(G/A)TAATC	Garcia and Powell (1998)
12S-2	GCATAAT(T/C)TAGAGCT(A/T)AA(G/A)TC	
16S-1	GTCCTTTTGTATTATTTAAG	
16S-2	AATTTAAAGGTCGAACAGACC	
COI_S1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	Normark (1996)
COI_A2442	GCTAATCATCTAAAAATTTTAATTCCTGTT GG	

I: inosine

Purification Kit (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the primers defined in Table 1 for each gene, and PCR conditions were optimized for this species by a touchdown approach. For 12S and 16S, the same amplification conditions were used: denaturation at 94° C for 3'; 5x (93° C for 1'; 54° C for 1'; 72° C for 2'); 5x (93° C for 1'; 53° C for 1'; 72° C for 2'); 25x (93° C for 1'; 52° C for 1'; 72° C for 2') and final elongation at 72° C for 15'. For COI, the PCR conditions described above were used, but the annealing temperatures were 46°, 45° and 44° C for each cycle, respectively. Amplifications by PCR were carried out in an Eppendorf Master Gradient Thermocycler (Brinkman Instruments, Westbury, NY).

Amplified products were visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Purified PCR products were sequenced using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's recommendations. Both strands were sequenced in an automated DNA sequencer (Applied Biosystems model 3100). Consensus sequences were edited and assembled using the SEQMAN program (Applied Biosystems), aligned using ClustalW (Larkin et al. 2007) available through Mega3 (Kumar et al. 2004), and manually checked thereafter. Pairwise and multiple alignments were run based on the IUB DNA weight matrix and parameter costs were set to 15.0 for gap opening and 6.66 for gap extension.

Fragments of mtDNA of the 12S and 16S ribosomal RNA, and the cytochrome oxidase I (COI) genes sequenced for *T. carcavalloi* were aligned with sequences of other species used in previous studies and available on GenBank (Table 2). Other species included representatives of "infestans complex," putatively related, *T. circummaculata*, and representatives of other *Triatoma*, *Panstrongylus*, and *Rhodnius*. No major incongruence was found among gene datasets based on the incongruence length difference (ILD, Farris et al. 1994) test conducted using PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 1998; COI vs 12S:  $p=0.21$ ; COI vs 16S:  $p=0.23$ ; 12S vs 16S:  $p=0.43$ ), showing that the three mtDNA fragments studied here could be combined for maximum parsimony (MP) analyses.

An hypothesis of phylogenetic relationships among *Triatoma* species was proposed based on the MP algorithm by heuristically searching for the best topology using 1,000 replicates of random addition sequence and tree-bisection-and-reconnection (TBR) branch swap. Bootstrap values were estimated with 1,000 pseudoreplicates. Additionally, another phylogenetic hypothesis was proposed based on Bayesian inference with the software MrBayes 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) using a mixed-model approach. The hierarchical likelihood ratio test implemented in MrModeltest (Nylander 2004) was used to select the GTR+G model as the appropriate evolutionary model for each partition. Even though the same general model was selected for each partition, parameters were still left to vary independently for each one. The Bayesian analysis was conducted with two independent runs of four Markov

chains for 1,000,000 generations from where 2,000 trees were sampled (sampled every 500th generation) and the average standard of split frequencies exhibited 0.005 at the end of the run. To summarize the information we discarded ~25% of the samples obtained during the first generations. *Rhodnius prolixus* was used as the outgroup for all analyses. Bayesian posterior clade probabilities were calculated as the majority-rule consensus. The best evolutionary model indicated by MrModeltest was applied to obtain the corrected Maximum Likelihood  $p$ -distances in order to make inferences on the genetic distances among taxa focused in this study.

### Morphometric analysis

Because head shape is an important character to define interspecific relationships (Lent and Wygodzinsky 1979, Patterson et al. 2001), we applied a traditional morphometric technique based on measurements between landmarks. The same investigator took all measurements using a stereoscope microscope (Zeiss) with a 2.5X objective and a 10X ocular.

Besides *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, and *T. rubrovaria* from the municipality of Encruzilhada do Sul, RGS, a second population of *T. rubrovaria* from Uruguay was added to the analysis. This *T. rubrovaria* population was taken from the "Laranja's Collection," deposited in the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute. Species used as outgroups (*T. sordida* [n=15] and *T. guasayana* [n=12]) were collected in the field in the states of Bahia, Brazil, and Santa Cruz, Bolivia (Table 3). Males and females of all species were included.

For each specimen, ten measurements derived from the head were recorded: outer distance between eyes (OE), inner distance between eyes (IO), external distance

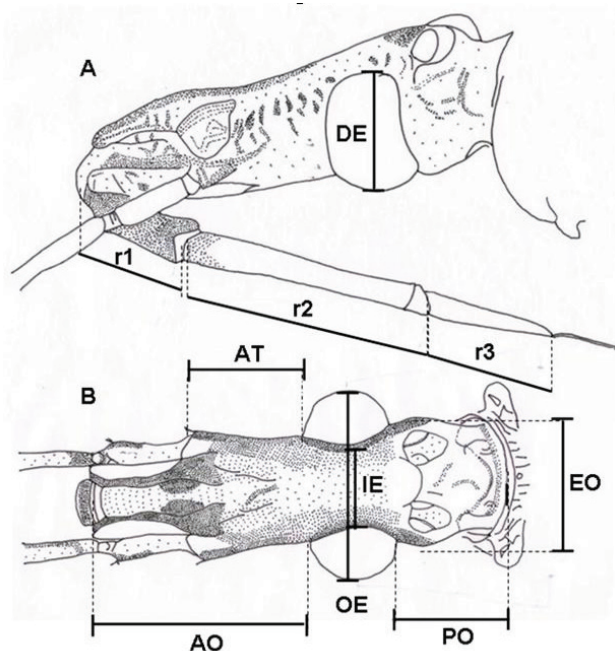


Figure 3. Scheme of morphometric measures taken on the head in a lateral (A) and dorsal view (B) of a *Triatoma rubrovaria* specimen.



Table 2. Accession codes from GenBank of sequences of all triatomine species included in this study.

Species	12S	16S	COI
<i>T. carcavalloii</i>	?		
<i>P. herreri</i>	AY185818	AY185833	AF449141.1
<i>P. megistus</i>	AF021178 AF021180	AF021177 AF021181	AF021179 AF021182
<i>R. prolixus</i>	AF324508 AF324509	AF324519	AF449138
<i>T. brasiliensis</i>	AF021187	AF021183 AF021185	AF021184 AF021186
<i>T. circummaculata</i>	AF021190	AF021188 AF021189	AF021191
<i>T. dimidiata</i>	AF324511	AF324522 AF324523 AF301594	AF449138
<i>T. guasayana</i>	AF021196	AF021192 AF021194	AF021193 AF021195
<i>T. infestans</i>	AF021197	AF021198	AF021199
<i>T. maculata</i>	AF324512	AF324524	AF449139
<i>T. mazzottii</i>	AF324514	AF324527	DQ198805
<i>T. platensis</i>	AF021200	AF021201	AF021202
<i>T. rubida</i>	AY185828	AY185842	DQ198801
<i>T. rubrovaria</i>	AF021207	AF021203 AF021205	AF021204 AF021206
<i>T. sordida</i> Arg	AF021208	AF021209	AF021210
<i>T. sordida</i> Bra	AF021211 AF021214	AF021212 AF021215	AF021213 AF021216
<i>T. vitticeps</i>	AF021217	AF021218	AF021219

García and Powell (1998), García et al. (2001), Dotson and Beard (2001), Gaunt and Miles (2002), and Sainz et al. 2004; Bra: Brazilian population; Arg: Argentine population.

between ocelli (EO), antecular distance (AO), post-ocular distance excluding neck (PO), diameter of the eye (DE), antenniferous distance (AD), and first (R1), second (R2) and third (R3) segmental distances of the rostrum (Figure 3). Analysis of variation in log-transformed head values was performed by breaking down the total variability in size and shape based on the Mosimann proposal. An interspecific comparison approach was used to remove the isometric components of changes (Darroch and Mosimann 1985), where size is described as an attribute of a specimen and shape involves preservation among specimens of different sizes. Consequently, these variables were scaled for size and the principal components computed (PCA). The PCA was done on the covariance matrix derived from the shape variables. Data were analyzed using the computer program BAC, JMP (SAS Institute 1999).

## RESULTS

### Ecotope and ecological observation

The arthropod fauna observed where *T. carcavalloii* was found was generally represented by *T. rubrovaria*, *T. circummaculata*, and the cockroach, *Blaptica dubia*. Field observations have not detected any ecological differentiation among the three triatomine species collected in the same ecotope. Those rock piles were characterized by loose and overlapping rocks in dry environments in the prairie. This sylvatic-like environment is herein called "ruderal" because it fits the description mentioned by Almeida et al. (2002a, 2008): an environment where the native vegetation was substituted by new pastures or short-lived cropland. Therefore, domesticated animals (e.g., caprines, equines, and bovines) were frequently observed in this environment, but wild homeothermic animals were seldom seen

(including their feces) among rock piles where triatomines were collected.

### Sequence variation

Fragments of 310, 450, and 468 base pairs for the 12S, 16S, and COI genes of *T. carcavalloii* were obtained, respectively. After alignment, the ends of sequences were cropped according to the shortest one, and analyses were conducted with 314, 410, and 401 base pairs for these genes (including gaps), following the order above. The six specimens of *T. carcavalloii* analyzed here exhibited only one haplotype for all three genes studied. The proportions of base frequencies for the three genes sequenced for *T. carcavalloii* were for: (1) COI, A=0.29, C=0.26, G=0.17, T=0.28; (2) 12S, A=0.30, C=0.10, G=0.20, T=0.40; and (3) 16S, A=0.29, C=0.08, G=0.22, T=0.41. These proportions

Table 3. Geographic distribution of the specimens analyzed for morphometrics.

Species	Collection Sites	Sex M/F	Total
<i>T. circummaculata</i>	Uruguay	2/1	3
<i>T. rubrovaria</i> UY	Uruguay	3/4	7
<i>T. rubrovaria</i> BR	Brasil	8/10	18
<i>T. carcavalloii</i>	Brasil	5/10	15
<i>T. guasayana</i>	Bolivia	7/5	12
<i>T. sordida</i>	Brasil	8/7	15

M: Males; F: Females. Samples from Uruguay came from the city of Montevideo; samples from Brazil came from Rio Grande do Sul State; samples from Bolivia came from the city of Santa Cruz.

Table 4. Mean and Standard deviation (within parentheses) from each head variable used on the study for the species studied. See Figure 3 for the details of measurements: Outer distance between eyes (OE), inner distance between eyes (IO), external distance between ocelli (EO), antocular distance (AO), post-ocular distance excluding neck (PO), diameter of the eye (DE), antenniferous distance (AD), and first (R1), second (R2), and third (R3) segmental distances of the rostrum.

Species*/Variables	OE	IO	EO	AO	PO	DE	AD	R1	R2	R3
<i>T. circummaculata</i>	1.194(0)	0.427(0.037)	0.942(0.044)	1.496(0.025)	0.153(0.05)	0.659(0.03)	0.772(0.052)	0.523(0.151)	1.386(0.025)	1.351(0.061)
<i>T. rubrovaria</i> (UY)	1.599(0.048)	0.827(0.118)	1.166(0.069)	1.837(0.051)	0.266(0.137)	1.066(0.088)	1.188(0.061)	0.97(0.07)	1.81(0.046)	1.033(0.054)
<i>T. rubrovaria</i> (BR)	1.641(0.052)	0.784(0.064)	1.174(0.041)	1.839(0.047)	0.262(0.106)	1.157(0.048)	1.169(0.074)	1.074(0.05)	1.821(0.05)	1.083(0.069)
<i>T. carvalhoi</i>	1.399(0.039)	0.688(0.064)	1.054(0.049)	1.742(0.059)	0.136(0.124)	0.787(0.058)	1.092(0.095)	0.911(0.101)	1.623(0.07)	1.108(0.055)
<i>T. guasayana</i>	1.508(0.058)	0.641(0.103)	1.061(0.048)	1.636(0.146)	0.162(0.176)	2.142(0.081)	0.977(0.081)	-0.067(0.126)	0.977(0.091)	1.612(0.043)
<i>T. sordida</i>	1.597(0.040)	0.626(0.063)	1.135(0.043)	1.500(0.042)	-0.01(0.074)	1.105(0.036)	0.723(0.072)	0.831(0.096)	1.70(0.05)	0.94(0.028)

\*See Table 3 for details about the sampling used.

of each gene fragment of *T. carvalhoi* did not significantly differ from those of other triatomine species included in this study (Chi-square test of homogeneity of base frequencies across taxa:  $p=1.00$ ). No regions of ambiguous alignment were detected.

Considering the three sympatric species, similar patterns of  $p$ -distances were exhibited for the 16S and COI. For these genes, *T. rubrovaria* vs *T. carvalhoi* exhibited the lowest  $p$ -distances (0.012 for the 16S and 0.025 for the COI), whereas  $p$ -distances for *T. rubrovaria* vs *T. circummaculata* were higher (0.017 for 16S and 0.035 for COI). Only the 12S gene showed the lowest  $p$ -distance for *T. rubrovaria* vs *T. circummaculata* (0.007). For this last gene, *T. rubrovaria* vs *T. carvalhoi* showed a  $p$ -distance at 0.010, while *T. circummaculata* vs *T. carvalhoi* showed the highest  $p$ -distance (0.016). Considering the outgroups (*T. guasayana* and *T. sordida*) vs all sympatric species herein focused, *T. guasayana* exhibited lower values of  $p$ -distances ( $<0.030$  for 12S,  $<0.025$  for 16S, and  $<0.090$  for COI; for all) than the ones exhibited by *T. sordida* ( $<0.052$  for 12S,  $<0.072$  for 16S, and  $<0.115$  for COI for all). The latter species exhibited lower values of  $p$ -distances with *T. rubrovaria* (0.042 for 12S, 0.060 for 16S, and  $<0.112$  for COI) than with *T. guasayana* (0.045 for 12S, 0.072 for 16S, and  $<0.120$  for COI).

#### Phylogenetic analyses

The resulting Bayesian consensus phylogram of the combined (12S+16S+COI) mixed-model data is shown in Figure 4. *T. carvalhoi* was recovered as sister-species to *T. rubrovaria*, and this clade a sister to *T. circummaculata*, forming the "rubrovaria subcomplex," supported by 99/68 of Bayesian posterior probability/ parsimony bootstrap. The maximum parsimony analysis of the combined genes recovered a single most parsimonious tree ( $L=986$ ,  $CI=0.53$ ,  $RI=0.50$ ) with the same topology as the Bayesian analysis for the sympatric species. The range of changes per site supported the taxonomic status for *T. carvalhoi* as a putative species. *Triatoma guasayana* was consistently placed as a sister species to members of "rubrovaria subcomplex" supported by 99/72 of Bayesian posterior probability/ parsimony bootstrap, respectively.

#### Traditional morphometric analyses

The isometric size variable revealed that females were larger than males for all characters in species groups, as shown by Dujardin et al. (2002) for other triatomines. *Triatoma circummaculata* had the smallest values for overall variants, whereas *T. rubrovaria* specimens had the largest (Figure 5). However, intraspecific variation (even between sexes) was diluted in a way that specific groupings were all well defined when both principal components are considered.

A principal component analysis was performed including the three sympatric species, *T. circummaculata*, *T. carvalhoi*, and *T. rubrovaria*, and two outgroups (*T. guasayana* and *T. sordida*) to find the linear combinations of the shape variables that explain the greatest variance in

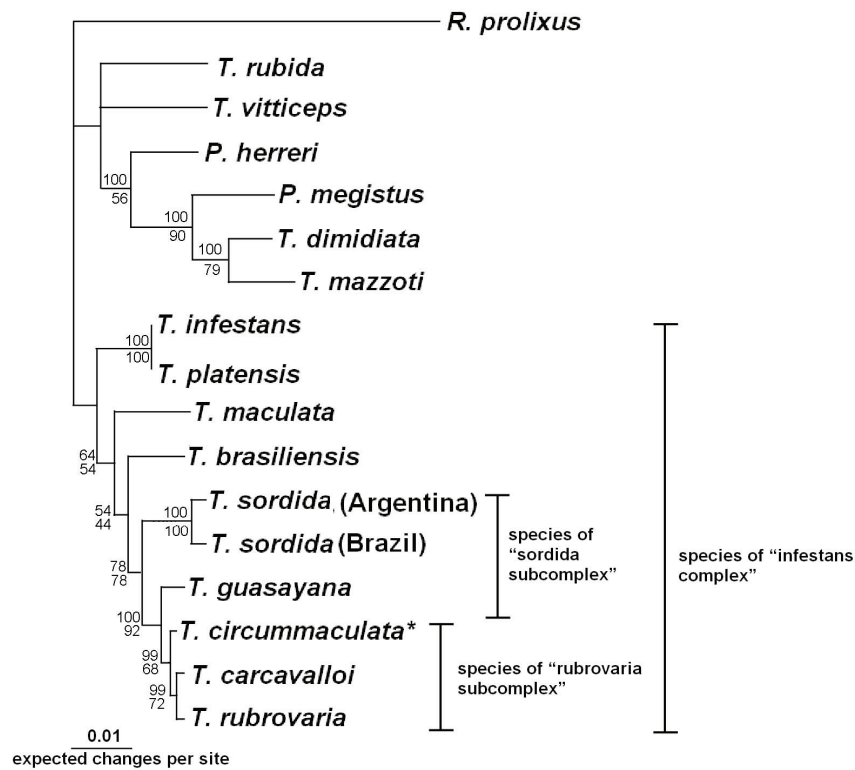


Figure 4. Bayesian Inference consensus of mixed-model analysis of five partitions of mitochondrial sequences of 12S rDNA (314bp), 16S rDNA (410bp), and cytochrome oxidase I (401bp, 3-codon partition). The values above the nodes indicate the Bayesian posterior credibility of clades whereas below are the parsimony bootstrap percentages. Accession code and references with details about the species are shown in the Table 1. Classification follows Dujardin et al. (2002), with the exception of *T. circummaculata* (marked with asterisk), which is herein placed in the "rubrovaria subcomplex."

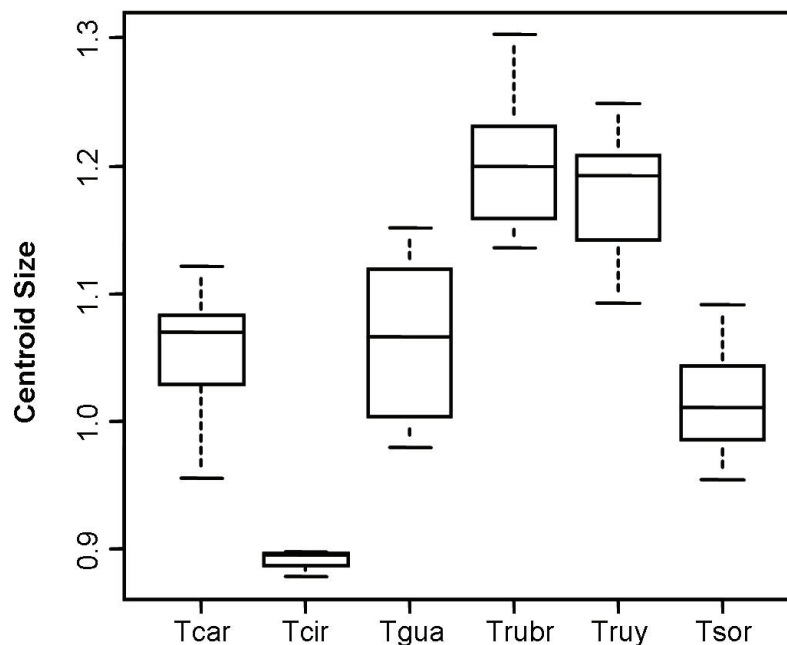


Figure 5. Boxplot of the centroid size based on ten variables of the head of *Triatoma carcavalloi* (Tcar), *T. circummaculata* (Tcir), *T. guasayana* (Tgua), *T. rubrovaria* from Brazil (Trubr) and Uruguay (Truy); and *T. sordida* (Tsor).

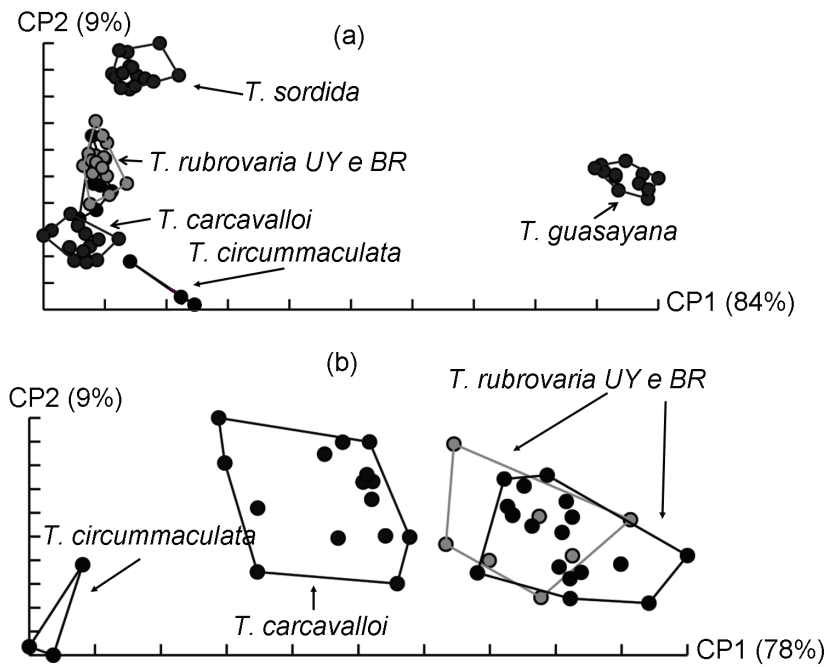


Figure 6. (a) Factorial map for the species studied: *Triatoma carvalhoi*, *T. rubrovaria* from Uruguay and Brazil, and *T. circummaculata*; including outgroups: *T. guasayana* and *T. sordida*, representing 93% of the total variation. This analysis derived from the first (CP1 = 84%) and the second Principal Component (CP2 = 9%). (b) Factorial map derived from CP1 (78%) and CP2 (9%), using only the three species herein. See Tables 3 and 4 for details about the sampling used.

the data (Figure 6a). Significant differences between groups were shown with PCA by plotting the first and second principal component factors on a factorial map. Figure 6a shows that the first two derived principal components exhibit 93% of the total shape variability in the groups. The first principal component clearly separates *T. guasayana* from the remaining species, while the second principal component separates *T. sordida* from the remaining sympatric taxa, *T. circummaculata* and the very closely associated group composed of *T. rubrovaria* (Uruguay and Brazil), and *T. carvalhoi*.

To get a more detailed separation among the three sympatric species, a second analysis was conducted using only *T. circummaculata*, *T. carvalhoi*, and *T. rubrovaria* species (Figure 6b). The first two derived principal components accounted for 87% of the total shape variability in the groups. The first component was able to significantly discriminate the three species. *Triatoma carvalhoi* was closer to both populations of *T. rubrovaria* (from Brazil and Uruguay) than to *T. circummaculata* (Figure 5b). This result is a reflection of overall morphological differences from the head variables, e.g., the anteclypeus, being distinctly shorter for *T. circummaculata* if compared to *T. rubrovaria* and *T. carvalhoi*. Furthermore, the third rostral segment was the most discriminant variable separating *T. circummaculata* by being longer than those of its allies; while the outer distance between the eyes, the external distance between ocelli, and the diameter of the eye were longer for *T. rubrovaria* than for *T. carvalhoi* (Table 4).

## DISCUSSION

Since *T. carvalhoi*'s description, no study has been performed to elucidate the phylogenetic, ecological, bionomic, or epidemiological aspects of this species. We described the ecotope where these species were collected and performed an analysis using molecular (mitochondrial DNA) and morphometric markers. The phylogenetic position of *T. carvalhoi* suggests that this species is unambiguously related to the other two sympatric species (*T. rubrovaria* and *T. circummaculata*) collected in the same location in the state of RGS and ecotope (rock piles) in prairies from Southern Brazil. All analyses recognized *T. carvalhoi* as a consistent species, and the relationships among its cohabitant allies (*T. rubrovaria* and *T. circummaculata*) were congruent among the different approaches used.

Morphological characteristics led Jurberg et al. (1998) to consider *T. carvalhoi* to be a closely related species to *T. rubrovaria*. Dujardin et al. (2002) presented a review of the triatomine complexes and subcomplexes based on morphological characters, where *T. circummaculata* was placed out of the "infestans complex." Dujardin et al. (2002) had already stated that this grouping has not been corroborated by previous molecular studies where *T. circummaculata* was found more closely related to members of the "infestans complex" (García and Powell 1998, García et al. 2001). Our molecular data set reinforces the previous findings based on DNA sequences, with the added evidence from our morphometrical analysis suggesting that *T. circummaculata* should be included in the "infestans complex" and not placed in a separate



complex. Both approaches used here further suggest that *T. circummaculata* should be placed more specifically in the “rubrovaria subcomplex.”

Usinger et al. (1966) and Schofield (1994) mentioned that *T. guasayana* and *T. sordida* were closely related and morphologically very similar. Similarly, Dujardin et al. (2002) placed these species, as well as *T. garciabesi* and *T. patagonica*, in the “sordida subcomplex” of the “infestans complex.” Despite the fact that *T. guasayana* and *T. sordida* are very morphologically similar and overlap in geographic distribution and ecotopes (mainly bromeliads and hollow trees) as observed by Noireau and Dujardin (2001) in the Bolivian Chaco, they can be readily separated by isoenzymatic analysis (Noireau et al. 1998). On the other hand, our resulting morphometric analysis did not identify these two species as being highly similar (Figure 6a). Furthermore, *T. guasayana* exhibited *p*-distance values that indicated that it was more closely related to members of “rubrovaria subcomplex” than to *T. sordida*. In the present phylogenetic analysis, the monophyly of the “sordida subcomplex” was not corroborated, because *T. guasayana* was consistently identified as a sister to members of “rubrovaria subcomplex” with high nodal support by both Bayesian and MP analyses (Figure 4). Whether morphological similarities between *T. sordida* and *T. guasayana* are a result of ecological pressure remains a question.

Morphometric analysis also demonstrated that *T. rubrovaria* from Brazil and Uruguay exhibited a degree of population differentiation that agrees with the intraspecific variation shown by Pacheco et al. (2003, 2007) for populations from these countries using molecular markers (RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences). We understand that phenotypic variability might be disturbed by various factors, such as ecotope, host, temperature, and others. However, the morphometric results for intraspecific and interspecific levels exhibited considerable agreement with genetic data in strongly supporting members of the “rubrovaria subcomplex” in relation to the outgroups chosen. We believe that morphometrics could better reflect the genetic relationships if we had included more specimens, improved the robustness of the results by using the geometric morphometrics approach, and increased the number of variables for the analysis.

Crossing experiments have been useful to enable inferences on the genetic relationships and reproductive compatibilities among taxa (Costa et al. 2003), thus we suggest reciprocal laboratorial crossing experiments among *T. rubrovaria*, *T. carvalhoi*, and *T. circummaculata* in order to better understand the relationships among these three cohabitant triatomines.

All three triatomine species, *T. carvalhoi*, *T. rubrovaria*, and *T. circummaculata* are restricted to the savanna-like or steppe-like subtropical mixed prairies in southern Brazil, northeastern Argentina, and Uruguay, with its closest species, *T. guasayana*, restricted to the Bolivian and Argentinian Chaco. During this study, all three focal species were found sharing a shelter in a specific locality, therefore apparently occupying the same ecological niche

in a disturbed environment. No hybrids were detected through morphological analysis; hence the event that drove the genetic differentiation remains a question. However we believe that they have recently converged to the habitat after speciation due to environmental changes caused by human activities. According to Almeida et al. (2002a, 2008), human activities can create the ruderal environment, which can produce propitious situations for the installation of some triatomines, since the predator fauna might be disturbed, and the blood food resource for triatomines can be improved by increasing domesticated animals, such as sheep chicken, goats, pigs, and cows. Four other triatomines (*T. brasiliensis*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, and *Rhodnius neglectus*) have already been found sharing the ecotope (peridomicile) as a result of human activities (Marchon-Silva et al. 1998). Therefore, we suggest looking for these three species where they occur in undisturbed environments.

Phylogenetic analysis suggested that *T. carvalhoi* is the sister species of *T. rubrovaria*, which was corroborated by a morphometric approach. We emphasize that *T. rubrovaria* presents bionomic characteristics of a good vector of *T. cruzi* (Almeida et al. 2000, 2002a,b, 2003, 2005) and can maintain high rates (25%) of natural infection by that parasite (Martins et al. 2003, 2008). According to Jurberg et al. (1998), *T. carvalhoi* can also invade human domiciles. Therefore, we recommend monitoring the domiciliary invasion by *T. carvalhoi*, and increasing our understanding of this species through biological, ecological, and genetic studies, as well as its interaction with *T. cruzi*.

#### Acknowledgments

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Strategic Program of Research in Health (PAPES 3/Oswaldo Cruz Foundation), and the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). We acknowledge the technicians of Funasa for their essential help in the field; anonymous referees, Karen Haag, Marli M. Lima, and L. Lynnette Dornak for kindly and carefully reviewing the manuscript, and Paula Constancia Pinto Aderne Gomes for improving the pictures.

#### REFERENCES CITED

- Almeida, C.E., R. Duarte, R.S. Pacheco, and J. Costa. 2002a. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 1127-1131.
- Almeida, C.E., E. Folly-Ramos, R. Agapito-Souza, G. Magno-Esperança, R.S. Pacheco, and J. Costa. 2005. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100: 231-235.
- Almeida, C.E., C.N. Francischetti, R.S. Pacheco, and J.

- Costa. 2003. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98: 367-371.
- Almeida, C.E., R.S. Pacheco, K. Haag, S. Dupas, E.M. Dotson, and J. Costa. 2008. Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78: 791-802.
- Almeida, C.E., R.S. Pacheco, F. Noireau, and J. Costa. 2002b. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 829-834.
- Almeida, C.E., M.C. Vinhaes, J.R. Almeida, A.C. Silveira, and J. Costa. 2000. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 761-768.
- Costa, J., C.E. Almeida, J.P. Dujardin, and C.B. Beard. 2003. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98: 637-639.
- Darroch, J.N. and J.E. Mosimann. 1985. Canonical and principal components of shape. Biometrika 1985 72: 241-252.
- Dotson, E.M. and C.B. Beard. 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. Insect Mol. Biol. 10: 205-215.
- Dujardin, J.P., C.J. Schofield, and F. Panzera. 2002. *Les Vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Academie Royale des Sciences d'Outre Mer. Bruxelles, Belgique.* 162 p.
- Farris, J.S., M. Källersjö, A.G. Kluge, and C. Bult. 1994. Testing significance of congruence Cladistics. 10: 315-319.
- García, B.A. and J.R. Powell. 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. J. Med. Entomol. 35: 232-238.
- García, B.A., E.N. Moriyama, and J.R. Powell. 2001. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. J. Med. Entomol. 38: 675-683.
- Gaunt, M.W. and M.A. Miles. 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. Mol. Biol. Evol. 19: 748-761.
- Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754-755.
- IBAMA - 2008. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/>
- Jurberg, J., D.S. Rocha, E.S. Lorosa, M.C. Vinhaes, and H. Lent. 1998. Uma nova espécie de *Triatoma* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol. Vect. 5: 295-310.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinformatics 5: 150-163.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23: 2947-2948.
- Lent, H. and P. Wygodzinsky. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163: 123-520.
- Marchon-Silva, V, J. Costa, R. Ribeiro, and L. Diotaiuti. 1998. Dados preliminares sobre a infestação concomitante de *Triatoma brasiliensis*, *T.sordida*, *T. pseudomaculata* e *Rhodnius neglectus*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 31: 181.
- Martins, L.P., R.E. Castanho, C. Casanova, D.T. Caravelas, G.T. Frias, A.L. Ruas-Neto, and J.A. Rosa. 2003. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39: 198-202.
- Martins, L.P., A. Marcili, R.E. Castanho, A.L. Therezo, J.C. Oliveira, R.B. Suzuki, M.M. Teixeira, J.A. Rosa, and M.A. Sperança. 2008. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79: 427-434.
- Noireau F., T. Gutierrez, M. Zegarra, R. Flores, F. Brenière, L. Cardozo, and J.P. Dujardin. 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. Trop. Med. Int. Hlth. 3: 364-372.
- Noireau, F. and J.P. Dujardin. 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96: 385-389.
- Normark, B.B. 1996. Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): evidence from mitochondrial DNA sequences. Evolution 50: 734-745.
- Nylander, J.A.A. 2004. *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pacheco, R.S., C.E. Almeida, J. Costa, D.R. Klisiowicz, S. Mas-Coma, and M.D. Bargues. 2003. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). Ann. Trop. Med. Parasitol. 97: 757-768.
- Pacheco, R.S., C.E. Almeida, D.R. Klisiowicz, J. Costa, M.Q. Pires, F. Panzera, M.E. Bar, S. Mas-Coma, and M.D. Bargues. 2007. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. Parasite 14: 231-237.

- Patterson, J.S., C.J. Schofield, J.P. Dujardin, and M.A. Miles. 2001. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old World species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. *Med. Vet. Entomol.* 15: 443-451.
- Sainz, A.C., L.V. Mauro, E.N. Moriyama, and B.A. García. 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121: 229-240.
- Santos-Mallet, J., M. Cardozo-de-Almeida, S.C. Novo, and T.C.M. Gonçalves. 2008. Morfologia Externa de *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Através da Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura. *EntomoBrasilis* 1: 37-42.
- SAS Institute 1999. JMP version 3.2.6. SAS Institute Inc. Website: <http://www.JMPdiscovery.com>.
- Schofield, C.J. 1994. *Triatominae: Biology and Control*. Eurocommunica Publ., Bognor Regis, UK, 80 pp.
- Schofield, C.J., J. Jannin, and R. Salvatella. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22: 583-588.
- Silveira, A.C. and M.C. Vinhaes. 1999. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 405-411.
- Swofford D.L. 1998. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Usinger, R.L., P. Wygodzinsky, and R.E. Ryckman. 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annu. Rev. Entomol.* 11: 309-330.
- World Health Organization. 2002. Control of Chagas' disease: second report of a WHO Expert Committee. *Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser* 905: 1-109.

## 2.1. Capítulo 3

**CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR, CASTRO-DE-SOUZA S, OLIVEIRA MLR, GONÇALVES TCM, SANTOS-MALLET J.** Ultrastructure and morphometry of eggs of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavallo* Juberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stal, 1895) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae).

**Submetido em Zootaxa, 2012.**



1  
2 **Ultrastructure and morphometry of eggs of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavallo***  
3 **Juberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stal, 1895) (Hemiptera-Reduviidae-**  
4 **Triatominae)**

5  
6 MARGARETH CARDOZO-DE-ALMEIDA<sup>1/2</sup>, SIMONE CASTRO-DE-SOUZA<sup>1</sup>, MARIA LUIZA RIBEIRO  
7 DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, TERESA CRISTINA MONTE GONÇALVES<sup>1</sup>, JACENIR REIS DOS SANTOS-MALLET<sup>1</sup>

8  
9 <sup>1</sup>*Laboratório Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense, Pavilhão Carlos Chagas, Instituto Oswaldo*  
10 *Cruz, FIOCRUZ, Av Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ Brasil (jacenir@ioc.fiocruz.br) (Corresponding author)*

11 <sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRRJ, Br 465 Km 07, 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil*

12  
13  
14  
15 **Abstract**

16 This study analyzed the body and the operculum of eggs of *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavallo* and  
17 *Triatoma circummaculata*, considered sylvatic species, which live in sympatry between each other. *T.*  
18 *rubrovaria* is currently considered the most important vector of *T. cruzi* in the rural areas of the state of Rio  
19 Grande do Sul, followed by *T. circummaculata*. Significant differences have been observed in the structures of  
20 the three species, using traditional microscopy and electronic scanning, other than morphometry. *T.*  
21 *circummaculata* eggs are smaller than those of *T. rubrovaria* and *T. carcavallo*. The average number of  
22 punctures per egg cell is higher for the *T. rubrovaria* and per operculum cell in *T. circummaculata*. This is the  
23 first morpho-structural description of *T. carcavallo* eggs. These results widen the concept of these three species  
24 and create new subsidies for the entomological monitoring in areas in which these vectors may infest human  
25 living quarters.

26  
27 Key words: Scanning electron microscopy – eggs – Triatominae – *Triatoma rubrovaria* – *Triatoma carcavallo*  
28 – *Triatoma circummaculata*

29

30

## 31 INTRODUCTION

32 The historic context of Chagas' disease in Rio Grande do Sul mentions eleven registered species, including  
33 *Triatoma infestans* (Klug, 1834) as the main vector of the disease's etiological agent, *Trypanosoma cruzi*. This  
34 triatomine has been targeted by control measures and attempts at eradication, according to the campaign of  
35 Cone Sul Initiative (Vinhaes & Dias 2000, WHO 2002, Martins et al. 2006, Ceballos et al. 2011). After  
36 eradication measures against *T. infestans* in the state of Rio Grande do Sul, this vector was considered  
37 eliminated in June 2006, when the Brazilian Ministry of Health was granted the International Certification of  
38 Elimination of Chagas' Disease Transmission for this triatomine, by the Pan-American Health Organization  
39 (Ferreira & Silva 2006, Schofield et al. 2006, Sonoda et al. 2010). Barata (1998) mentioned that while the  
40 vector is now eliminated, it is still necessary to continue studying these insects, in particular the stages  
41 relatively little known between which the eggs can be encountered.

42 According to data obtained over by the Brazilian National Health Foundation (Funasa) the last 20 years,  
43 during the Chagas Disease Control Program (PCDCH), *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Fig.1) is now  
44 the most commonly captured triatomine in Southern Brazil (Almeida et al. 2000, 2005). In spite of all efforts to  
45 control it, *T. infestans* still occurs in some towns in the north-western, center and southern areas of the state  
46 (Ruas-Neto & Corseuil 2002, Dias 2007, Sonoda et al. 2009).

47 According to Lent & Wygodzinsky (1979) the geographical distribution of *T. rubrovaria* in Brazil used  
48 to concentrate in the states of Paraná and Rio Grande do Sul, but is currently restricted to the endemic area of  
49 Chagas' disease in Rio Grande do Sul (Rosa, 1995). In its natural environment this species lives in rocky  
50 fissures and invades human living quarters when their own environment is intensely altered by man and when  
51 *T. infestans* is eliminated from a household, leaving an empty, available niche to be filled (Salvatella et al.  
52 1995, Almeida et al. 2000, Oscherov et al. 2004, Santos et al. 2009). It gradually adapts to the peri-household  
53 and colonizes the intra-household, becoming an important secondary vector (Salvatella et al. 1994, Almeida et  
54 al. 2002). This species feeds on a variety of hosts, including man. The period of time between feeding and the  
55 first defecation is short, typical of an efficient vector of the etiologic agent of Chagas' disease (Bar et al. 2003).

56 *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent 1998 (Fig.2) was described based on four females  
57 collected in the municipalities of Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão and Dom Feliciano (RS). This  
58 species is sympatric with *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* lives in the peri-household and in the living

59 quarters themselves, and was considered similar to *T. rubrovaria* as it can be identified by the intense orange  
60 color of the posterior lobe of the pronotum, the chorion and the sharp shape of the front pronotum angle, other  
61 than by its morphologic characteristics regarding length and width of head, the rostrum, eye size and smaller  
62 abdomen, giving it a rounded shape, and of the gonocoxite of the ninth segment. After this description this  
63 species was recorded in the municipality of Encruzilhada do Sul (RS); a specimen in the nymphal stage was  
64 captured and reached its adult phase in the laboratory (Almeida et al. 2002).

65 *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Fig. 3) is the most important species in Uruguay after *T.*  
66 *infestans*. Its geographical distribution in Brazil is restricted to Rio Grande do Sul. This species occupies  
67 ecotopes similar to those of *T. rubrovaria* and they can sometimes be found together (Lent & Wygodzinsky  
68 1979, Rosa et al. 2000). Phylogenetic studies with *T. circummaculata* based on DNA sequencing included this  
69 species in the *T. infestans* complex, although that would not be the case if only the morphologic classification  
70 was taken into consideration (Garcia et al. 2001). Sainz et al. (2004) also analyzed sequences of *T.*  
71 *circummaculata* mitochondrial DNA based on morphology and confirmed the inclusion of this species, but as a  
72 member of a different complex within the *T. infestans* complex.

73 The aim of this study was to make a comparative analysis of the morphologic and morphometric aspects  
74 of the exochorion of bodies and operculum of eggs of *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* and *T. circummaculata*  
75 under light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM). We also studied the homogeneity of  
76 the diameter of the egg operculum.

77

78

## MATERIALS AND METHODS

The eggs of *T. rubrovaria*, *T. carvalhoi* and *T. circummaculata* were obtained from colonies maintained in Setor de Entomologia Médica e Forense, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz. The field specimens had been collected in the natural ecotope, in October 2005 and October 2011, in municipality of Encruzilhada do Sul (30°32'38"S; 52°31'19"W).

### 1) Light Microscopy

For morphometric analysis 30 eggs (body and operculum) were randomly picked up and placed on double-sided adhesive tape that was stuck onto a slide for subsequent viewing under a stereoscopic microscope to measure length and width.

Drawings of slide-mounted preparations of entire operculum and body fragments of eggs were made using a camera lucida in Leitz-Dialuz 20EB light microscope at 40x enlargement.

Morphometric data were submitted to variance analysis (ANOVA) at a significance of 5% and SNK (Student-Newman-Keuls test) to compare all pairs of means following one-way ANOVA. In all tests SPSS-Windows, version 10 was used.

### 2) Scanning electron microscopy

For the morphological analysis 10 body eggs and 10 operculum were placed on small pieces of double-sided adhesive tape that were adhered onto scanning electron microscopy (SEM) stubs. They were sputtered with gold to be observed in a Jeol 5310 scanning electron microscope at 750x, 1000x and 1500x enlargement. The pictures were made in the central zone of the exochorion of body and lid of the eggs and thirty cells of these regions were counted, for the number of perforations.

## RESULTS

The exochorion of *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* and *T. circummaculata* eggs are similar, with hexagonal rough areas, separated by dots and limited by short intercepted lines or not by dots (Fig. 4A, 4B e 4C).

The operculum of the three species is externally convex, formed by hexagonal cells, mostly with an “upholstered” aspect (Fig. 4D, 4E e 4F).

The limiting opercular line of the three species consists of a cementing mass, called sealing band, which fixes the operculum to the chorial edge of the egg.

The morphometric study shows evident differences: average width and length of the egg exochorium are 1.17 mm and 1.65 mm for *T. rubrovaria*, 1.23 mm and 1.59 mm for *T. carcavalloi* and 0.88 mm and 1.47 for *T. circummaculata* (Table 1). The average diameter of the operculum is 0.71 mm in the case of *T. rubrovaria*, 0.64 mm for *T. carcavalloi* and 0.56 mm for *T. circummaculata* (Table 2).

The statistic test highlighted (ANOVA) a significant difference between the three populations, in terms of egg body as well as of operculum ( $p < 0,05$ ,  $p = 0,0$ ). We applied the test Student-Newman-Keuls (SNK), obtaining a pattern of separation in groups according to the averages obtained for each sample. Each character was analyzed separately (width, length and diameter). The final results show that there were three separate groups for egg width and operculum diameter, and only two for length (Table 3).

Thirty exochorium cells from the central region of the egg and from the operculum of *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* and *T. circummaculata* were analyzed using MEV, to quantify the number of perforations per cell. In the case of *T. rubrovaria* the average number of perforations per egg cell and operculum cell was 44.3 (Fig. 5A) and 8,2 (Fig. 5D), 20.8 (Fig. 5B) and 7.5 (Fig. 5E) for *T. carcavalloi* and 35.0 (Fig. 5C) and 13.3 (Fig. 5F) for *T. circummaculata*, respectively. These punctures in *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* are distributed on the entire surface of the cells, including on the edges, unlike *T. carcavalloi* which has very few perforations on the edges (they are mostly concentrated on the central region of each cell). From a general overview, *T. circummaculata* eggs are smaller than *T. rubrovaria* and *T. carcavalloi*. The average number of perforations per egg cell is higher in *T. rubrovaria* and the average per operculum cell is higher in *T. circummaculata*.

## DISCUSSION

The eggs of the Triatominae subfamily have been studied for decades. Pinto (1924) described the eggs of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and Galliard (1935) showed the importance of the aspect of exochorium sculpture for taxonomy, stating that the shells of the eggs of the Triatominae family presented a characteristic, constant ornament on their outer surfaces, which distinguishes one species from another. Other than this feature, Galliard used other macroscopic characters, such as size, shape, color, type of shell and fixation, among others, in his study of triatomine eggs. Some authors, however, based their studies on the morphologic structures of eggs between species (Barata, 1981, Gonçalves et al. 1985, Rosa et al. 2000).

The *Triatoma* genus presents high variability of features in the exochorium macroscopic level, characterized by hexagonal cells with indeterminate limiting lines, with perforations of variable size and shape. This feature is typically detected in ten species, including *Triatoma rubrovaria* (Barata, 1995).

This study confirms the general aspect of *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* and *T. circummaculata* eggs for the *Triatoma* genus, and shows the existence of morphologic features which are quite different between species. It is important to note that this is the first morphologic and morphometric description of *carcavalloii* eggs.

Besides the remarkable difference in terms of size between eggs of *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* and *T. circummaculata*, we observed two other morphologic differences between these three species. The number of perforations per egg cell of *T. rubrovaria* is higher than for *T. carcavalloii* and *circummaculata*, and these perforations on the exochorium of eggs and operculum of *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* are distributed all over the cells, while in the case of *T. carcavalloii* the perforations are mostly concentrated in the central region of each cell.

The texture of *T. rubrovaria* and *T. carcavalloii* exochorium of egg and operculum is analogous to the eggs of *T. maculata* and *T. brasiliensis*, as shown by Gonçalves et al. (1985) and Jurberg et al. (1986).

The observations on the opercular limiting line of the three species assessed in this study are in accordance with the data obtained by Rosa et al. 2000 for *T. rubrovaria* and *T. circummaculata*.

According to Costa et al. (1997), different environmental conditions, such as available source of food, temperature and humidity may affect egg morphology directly or indirectly. However, this study did not consider different environmental conditions, as *T. rubrovaria* was found living in sympatry with *T. carcavalloii* and *T. circummaculata*.

58 Other than the chromatic and morphologic differences between *T. rubrovaria* and *T. carcavalloi*  
59 described by Jurberg et al. (1998) and of *T. rubrovaria* described by Rosa et al. (1999), this study can use the  
60 morphologic differences between the eggs to show that *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* e *T. circummaculata* are  
61 distinct species.

62 These results widen the specific concept of *T. carcavalloi* and create the subsidies for a more specific  
63 monitoring of species which invade domiciliary ecotopes, during the vector control campaigns run by the  
64 Health Agencies in the south of Brazil.

65

66

67

68 **ACKNOWLEDGEMENTS**

69 To Hertha Meyer Cellular Ultrastructure Laboratory of Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, UFRJ for  
70 allowing the use of the scanning electron microscope; to Hematozoários Laboratory (IOC/FIOCRUZ) for  
71 allowing the use of light microscope; to Prof. Alfredo Carlos de Azevedo for guidance on statistical procedures  
72 and Mr. Adalberto José da Silva and Mrs. Ana Paula Rufino Amaro Sant Anna for technical support.

73

74

75

76

77



## 78 REFERENCES

- 79 Almeida CE, Folly-Ramos E, Agapito-Souza R, Magno-Esperança G, Pacheco RS, Costa J 2005. *Triatoma*  
80 *rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera – Reduviidae – Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector  
81 capacity of nymphs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 231-235.
- 82 Almeida CE, Duarte R, Nascimento RG, Pacheco RS, Costa J 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)  
83 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: Trophic resources and ecological observations of five populations  
84 collected in the state of Rio Grande do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1127-1131.
- 85 Almeida CE, Vinhaes MC, Almeida JR, Silveira AC, Costa J 2000. Monitoring the domiciliary and  
86 peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae,  
87 Triatominae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 761-768.
- 88 Bar ME, Milano AMF, Damborsky MP, Oscherov EB, Avalos G 2003. Patrones de alimentación y de  
89 defecación de *Triatoma rubrovaria* (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. *Rev Soc*  
90 *Entomol Argentina* 63: 107-113.
- 91 Barata JMS 1998. Macroscopic and exocorial structures of Triatomines eggs (Hemiptera, Reduviidae).  
92 Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), pp. 409-448. In  
93 RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent (eds.), Atlas of Chagas Disease Vectors in the  
94 Americas, Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas, Vol. 2, Fiocruz, Rio de Janeiro.
- 95 Barata JMS 1995. Pp. 55-58. In Proc Inter workshop on population genetics and control of Triatominae,  
96 Ecuador.
- 97 Barata JMS 1981. Morphological aspects of Triatominae eggs. II - Macroscopic and exochorial characteristics  
98 of 10 species of the genus *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera - Reduviidae). *Rev Saude Publica* 15: 490-542.
- 99 Ceballos LA, Piccinali RV, Marcet PL, Vazquez-Prokopec GM, Cardinal MV 2011. Hidden Sylvatic Foci of  
00 the Main Vector of Chagas Disease *Triatoma infestans*: Threats to the Vector Elimination Campaign? *PLoS*  
01 *Negl Trop Dis* 5(10): 1-13.
- 02 Costa J, Barth OM, Marchon-Silva V, Almeida CE, Freitas-Sibajev MGR, Panzera F 1997. Morphological  
03 studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structures  
04 and eggs of different chromatic forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 493-498.

- 05 Garcia BA, Moriyama EN, Powell JR 2001. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera:  
06 Reduviidae): phylogenetic relationships. *J Med Entomol* 38: 675-83.
- 07 Galliard H 1935. Recherches sur les Reduviidés Hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. V. Morphologie de  
08 l'oeuf des Triatomes. *Ann Parasit Hum Comp* 13: 511-527.
- 09 Gonçalves TCM, Jurberg J, Costa JM, Souza W 1985. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de  
10 *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Côrrea & Espínola, 1964 (Hemiptera,  
11 Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 263-276.
- 12 Jurberg J, Rocha DS, Lorosa ES, Vinhaes M, Lent H 1998. Uma nova espécie de *Triatoma* do estado do Rio  
13 Grande do Sul (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol Vect* 5 (6): 295-310.
- 14 Jurberg J, Gonçalves TCM, Costa JM, Sousa W 1986. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de  
15 *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81:  
16 111-120.
- 17 Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as  
18 vectors of Chagas' disease. *Bull American Mus Nat Hist* 163: 123-520.
- 19 Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano AMF 2004. Tablas de vida de fecundidad de *Triatoma*  
20 *rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Heteroptera: Reduviidae) em condiciones experimentales. In: *Jornadas de*  
21 *Comun. Cient. y Tecnol. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina.*  
22 <http://www.unne.edu.ar/cyt/2004/>
- 23 Pinto C 1924. Biologia do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Sciência Médica* 2: 541-543.
- 24 Rosa JA, Barata JM, Santos JLF, Cilense M. 2000. Morfologia dos ovos de *Triatoma circummaculata* e  
25 *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saude Publica* 34: 538-542.
- 26 Rosa JA, Barata JMS, Cilense M, Belda FMN 1999. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of  
27 *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Int J Insect Morphol Embryol*  
28 28: 363-75.
- 29 Rosa JA 1995. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de 1° e de 5° estádios de *Triatoma*  
30 *circummaculata* (Stal, 1859) e de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Ph. D.  
31 thesis, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 32

- 33 Ruas-Neto AL, Corseuil E 2002. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres  
34 como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).  
35 *Entomol Vect* 9: 231-249.
- 36 Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, Garcia BA 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*  
37 suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121: 229-40.
- 38 Salvatella R, Rosa R, Basmadjian Y, Puime A, Calegari L, Guerrero J, Martinez M, Mendaro G, Briano D,  
39 Montero C, Wisnivesky-Colli C 1995. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild  
40 and peridomestic environments of Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 325-328.
- 41 Salvatella R, Calegari L, Puime A, Basmadjian Y, Rosa R, Guerrero J, Martinez M, Mendaro G, Briano D,  
42 Montero C 1994. Feeding pattern of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) in  
43 peridomestic habitats, of a rural area of Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36: 311-320.
- 44 Santos CM, Jurberg J, Galvão C, Martinez M 2009. Morfometria comparada de *Triatoma infestans*, *T.*  
45 *rubrovaria* e *T. platensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Uruguai. *Iheringia Sér Zool* 99(1): 56-  
46 60.
- 47 Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588.
- 48 Silveira AC 2000. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saúde*  
49 *Publica* 16 (Suppl. 2): 35-42.
- 50 Sonoda IV, Dias LS, Bezerra CM, Dias JCP, Romanha AJ, Diotaiuti L 2010. Susceptibility of *Triatoma*  
51 *brasiliensis* from state of Ceará, Northeastern Brazil, to the pyrethroid deltamethrin. *Mem Inst Oswaldo*  
52 *Cruz* 105(3): 348-352.
- 53 Sonoda IV, Pessoa GCD, Cortez MR, Dias JCP, Romanha AJ, Diotaiuti L 2009. Susceptibility of *Triatoma*  
54 *infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(4): 668-670.
- 55 Vinhaes MC, Dias JCP 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública* 16 (Suppl. 2): 7-12.
- 56 WHO (World Health Organization) 2002. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization.  
57 (WHO Technical Report Series 811).
- 58  
59  
60  
61  
62

Table 1- Morphometry of body eggs of *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavalloi* and *Triatoma circummaculata* (mm)

Measures		Species	<i>T. rubrovaria</i>	<i>T. carcavalloi</i>	<i>T. circummaculata</i>
Length	maximum		1,77	1,81	1,54
	minimum		1,54	1,38	1,40
Standard Deviation	average		1,65	1,59	1,47
			0,059	0,116	0,042
Width	maximum		1,23	1,31	0,94
	minimum		1,11	1,15	0,82
Standard Deviation	average		1,17	1,23	0,87
			0,039	0,055	0,039

Table 2- Morphometry of operculum of *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavalloi* and *Triatoma circummaculata* (mm)

Measures		Species	<i>T. rubrovaria</i>	<i>T. carcavalloi</i>	<i>T. circummaculata</i>
Diameter	maximum		0,76	0,70	0,64
	minimum		0,66	0,58	0,52
	average		0,71	0,64	0,56
Standard Deviation			0,031	0,034	0,039

91 Table 3- Homogeneity of eggs width of *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavalloi* and *Triatoma*  
 92 *circummaculata*. Student-Newman-Keuls (SNK) test.

		Set		
Population	N	1	2	3
<i>T. circummaculata</i>	30	0,8773		
<i>T. carcavalloi</i>	30		1,1673	
<i>T. rubrovaria</i>	30			1,2313
Significance	30	1,000	1,000	1,000

93 N= number of eggs

94

95

96

97

98

99

00

01 Table 4- Homogeneity of eggs length of *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavalloi* and *Triatoma*  
 02 *circummaculata*. Student-Newman-Keuls (SNK) test.

		Set	
Population	N	1	2
<i>T. circummaculata</i>	30	1,4673	
<i>T. carcavalloi</i>	30		1,6347
<i>T. rubrovaria</i>	30		1,6483
Significance	30	1,000	0,504

03 N= number of eggs

04

05

06

07 Table 5- Homogeneity of operculum diameter of *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavalloi* and *Triatoma*  
08 *circummaculata*. Student-Newman-Keuls (SNK) test.

		Set		
Population	N	1	2	3
<i>T. circummaculata</i>	30	0,5773		
<i>T. carcavalloi</i>	30		0,6337	
<i>T. rubrovaria</i>	30			0,7047
Significance	30	1,000	1,000	1,000

11 N= number of eggs

12

13

14

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

Figure 1: *Triatoma rubrovaria*.

Figure 2: *Triatoma carcavalloi*.

Figure 3: *Triatoma circummaculata*.

Figure 4: – Drawings of slide-mounted preparations of eggs exochorion under light microscopy: A - *Triatoma rubrovaria*, B - *Triatoma carcavalloi*, C - *Triatoma circummaculata*. Drawings of slide-mounted preparations of operculum under light microscopy: D - *Triatoma rubrovaria*, E - *Triatoma carcavalloi*, F - *Triatoma circummaculata*.

Figure 5: Scanning electron microscopy of exochorion of the eggs: A - *Triatoma rubrovaria* – 1000x, B - *Triatoma carcavalloi* – 750x, C - *Triatoma circummaculata* – 1000x. Scanning electron microscopy of exochorion of the operculum: D - *Triatoma rubrovaria* – 1000x, E - *Triatoma carcavalloi* – 750x, F - *Triatoma circummaculata* – 1500x.

43 Figure 1: *Triatoma rubrovaria*.



44

45 Figure 2: *Triatoma carcavalloii*.

46



47

48

49



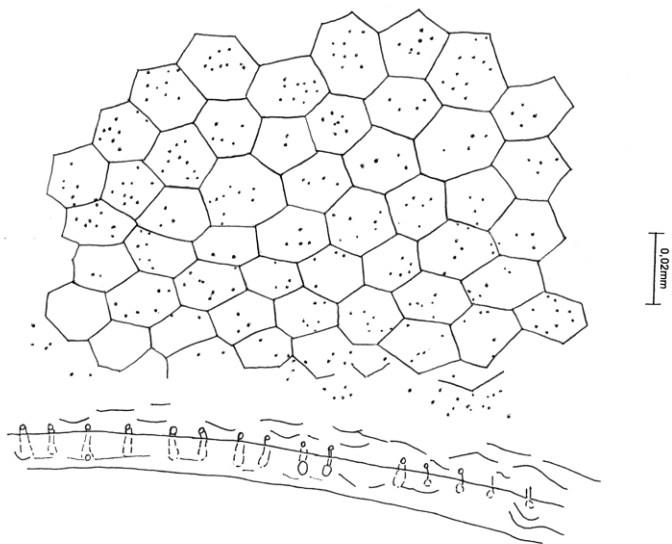
50 Figure 3: *Triatoma circummaculata*.



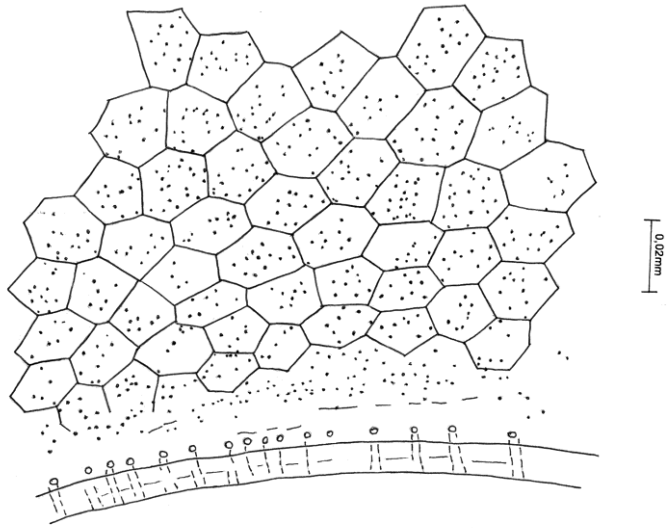
51

52

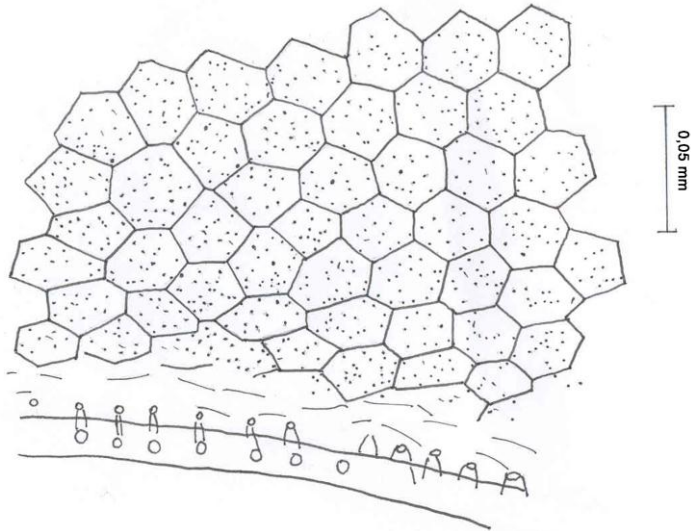
53 Figure 4: – Drawings of slide-mounted preparations of eggs exochorion under light microscopy:



54 A - *Triatoma rubrovaria*,



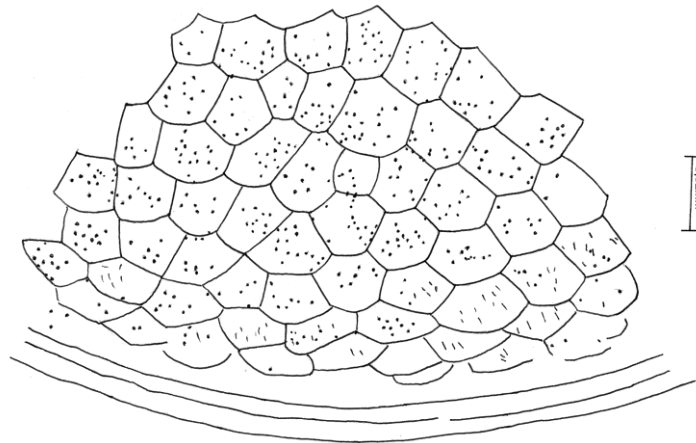
55 B - *Triatoma carcavalloi*,



56 C - *Triatoma circummaculata*.

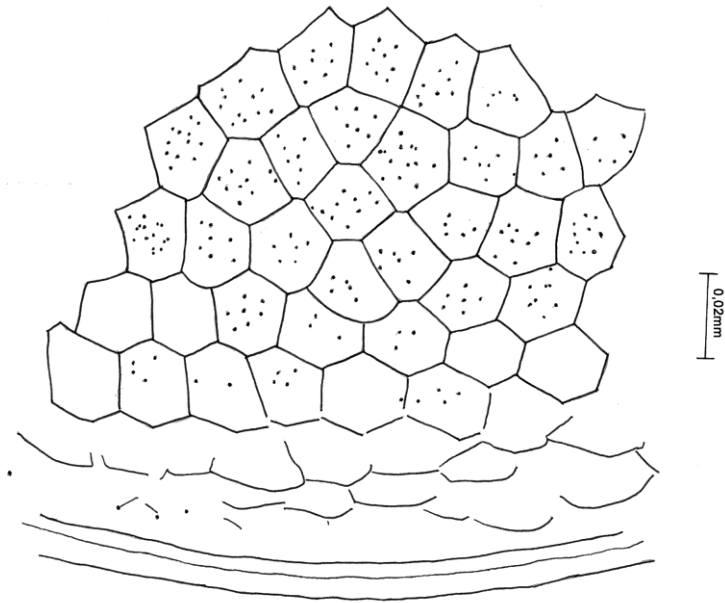
57

58 Drawings of slide-mounted preparations of operculum under light microscopy:

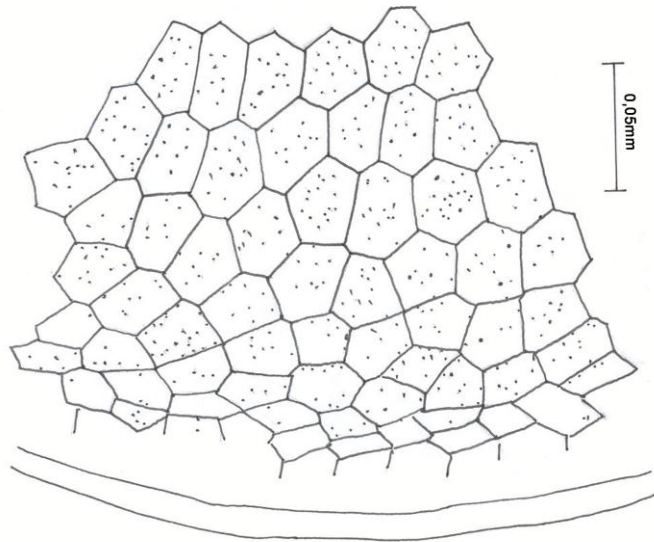


59 D - *Triatoma rubrovaria*,

60



61 E - *Triatoma carcaivalloi*,



62 F - *Triatoma circummaculata*.

63

64

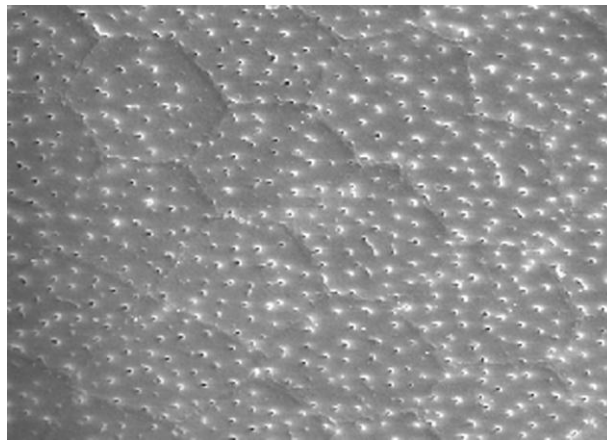
65

66

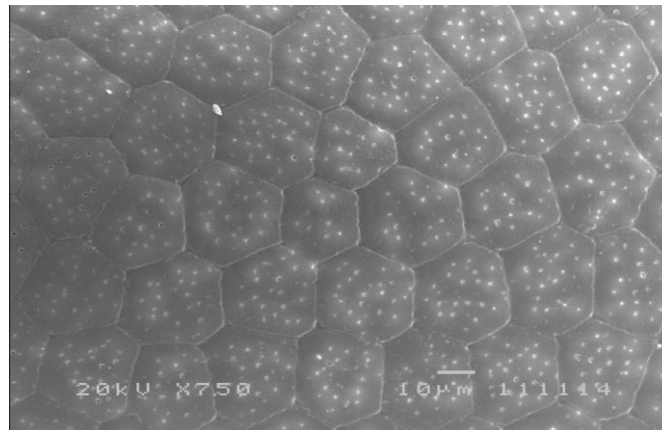
67

68 Figure 5: Scanning electron microscopy of exochorion of the eggs:

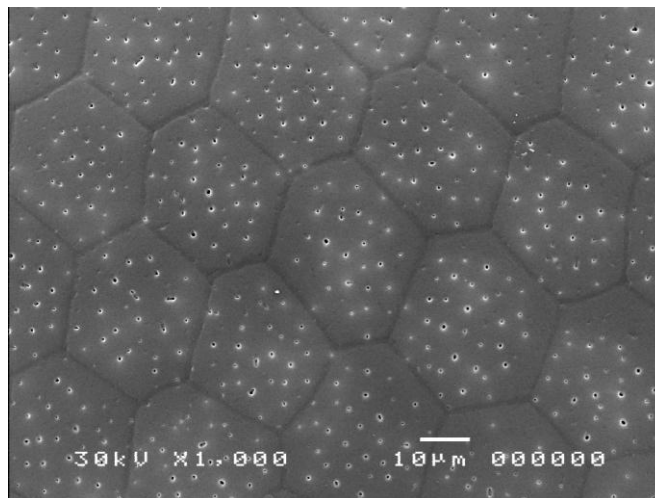
69 A - *Triatoma rubrovaria* – 1000x,



70 B - *Triatoma carcavalloei* – 750x,



71 C - *Triatoma circummaculata* – 1000x.



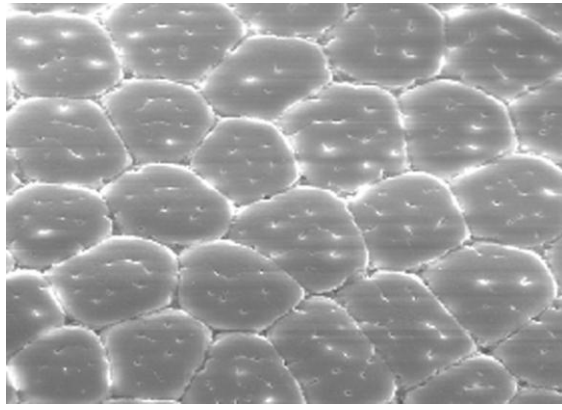
72

73

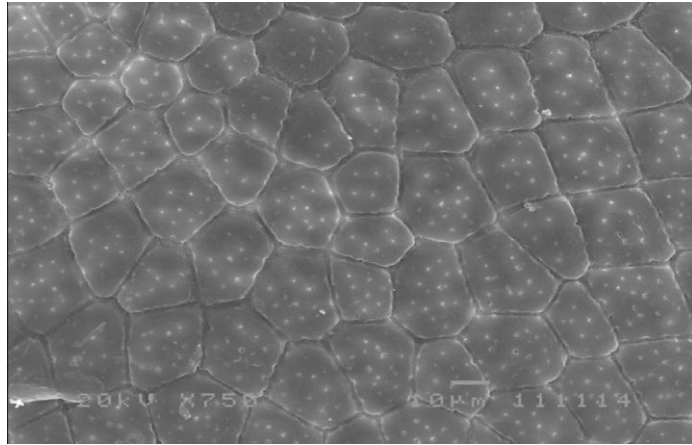
74

75

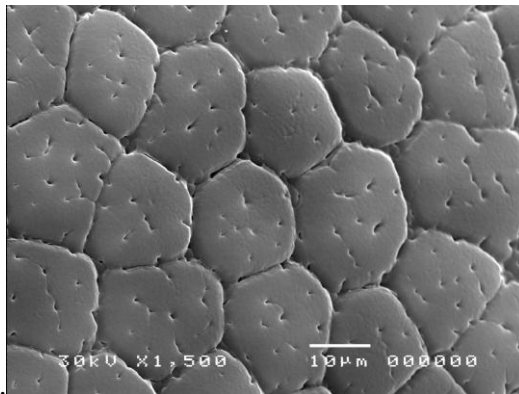
76 Scanning electron microscopy of exochorion of the operculum:



77 D - *Triatoma rubrovaria* – 1000x,



78 E - *Triatoma carcavalloi* – 750x,



79 F - *Triatoma circummaculata* – 1500x.

80

81

82

83

84

## **2.1. Capítulo 4**

**CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR, TEVES-NEVES S, ALMEIDA S, LIMA N, MALLET J, GONÇALVES TC. *Biologia de Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 sob condições laboratoriais.**

**Submetido em Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2012.**



**Biologia de *Triatoma carcavalloi* Jurberg, Rocha & Lent,  
1998 sob condições laboratoriais**

Journal:	<i>Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i>
Manuscript ID:	RSBMT-2012-0048
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	Triatominae, <i>Triatoma carcavalloi</i> , Comportamento biológico

SCHOLARONE™  
Manuscripts

View Only

1  
2  
3  
4  
5 **Margareth Cardozo-de-Almeida<sup>1,2</sup>, Simone Caldas Teves Neves<sup>1</sup>, Sérgio Antônio**  
6  
7 **Silva de Almeida<sup>1</sup>, Nathanielly Rocha Casado de Lima<sup>1</sup>, Jacenir Reis dos Santos-**  
8  
9 **Mallet<sup>1</sup> & Teresa Cristina Monte Gonçalves<sup>1</sup>**  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

18 1. Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e  
19 Forense, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av Brasil 4365, 21045-900 Rio de  
20 Janeiro, RJ Brasil  
21  
22  
23

24 2. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRRJ, Br 465 Km 07, 23890-  
25 000 Seropédica, RJ, Brasil  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

34 **Endereço:** Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet. Lab. Transm. Leishmanioses/Setor  
35 Entomologia Médica e Forense/Fiocruz. Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ.  
36  
37  
38 Brazil.

39  
40  
41 e-mail: jacenir@ioc.fiocruz.br  
42

43 Tel: 55 21 2562-1352/1232  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 **Biologia de *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 sob**  
4 **condições laboratoriais**  
5  
6  
7  
8  
9

10 Biology of *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 under  
11 laboratory conditions  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 **Biologia de *Triatoma carcavallo***  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 ABSTRACT  
30

31 **Introduction:** *Triatoma carcavallo* is considered a wild species, lives in sympatry with  
32 *T. rubrovaria* and *T. circummaculata*, currently important vectors of *T. cruzi* in the rural  
33 area of Rio Grande do Sul. **Methods:** Fertility-verified the color of eggs and hatch out  
34 or not. Incubation period-observed the eggs until the hatching. First meal-offered until  
35 10 minutes the nymphs of 1<sup>st</sup> stage newly hatched. Intermolt period-considered the  
36 number of days between two consecutive ecdysis. Number of blood meals-quantified at  
37 each nymphal stage. Resistance to fasting-considered the period between the ecdysis  
38 and the death of the insect. Mortality-calculated to each nymphal stage moulted to  
39 adulthood considering the deaths. Longevity-measured the time elapsed since each  
40 individual moulted to the adult stage until its death. Development cycle-the  
41 development times of different stages to adulthood recorded in days. **Results and**  
42 **conclusions:** The average incubation period of the eggs was 22.7 days. The first meal  
43 occurred at 3.13 days after hatching. The intermoulting period was longer in N5-adult  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 193.43. The average of feedings during the nymphal development was 13.4. Resistance  
4  
5 to fasting-indicated that nymphs of 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> stages presented higher resistance  
6  
7 than adults. The highest mortality rate was registered in N3 (22.2%). The average adult  
8  
9 survival was 25.6 weeks. The average total life cycle was 503.4 days. This is the first  
10  
11 report on the biology of *T. carcavalloi* fed on mices. Expanded the bionomic knowledge  
12  
13 of this species, besides contributing to colony control and understand the possible  
14  
15 participation in the transmission of *T. cruzi*.  
16  
17

18  
19  
20  
21 *Key-words:* Triatominae. *Triatoma carcavalloi*. biological behavior.  
22  
23

## 24 25 26 27 RESUMO

28  
29 **Introdução:** *Triatoma carcavalloi* é considerado espécie silvestre, vive em simpatria  
30  
31 com *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*, atualmente importantes vetores de *T. cruzi* na  
32  
33 área rural do Rio Grande do Sul. **Métodos:** Fertilidade-verificou a cor dos ovos e se  
34  
35 eclodiu ou não. Período de incubação-observou os ovos até eclosão. Primeira  
36  
37 alimentação-oferecida até 10 minutos as ninfas de 1<sup>st</sup> estágio recém-eclodidas. Período  
38  
39 de intermuda-considerado número de dias entre duas ecdises consecutivas. Número de  
40  
41 refeições sanguíneas-quantificada para cada fase ninfal. Resistência ao jejum-  
42  
43 considerado período entre ecdise e morte do inseto. Mortalidade-calculada para cada  
44  
45 fase ninfal até adulto, considerando as mortes. Longevidade-mediou o tempo decorrido  
46  
47 em que cada indivíduo mudou para o estágio adulto até sua morte. Ciclo de  
48  
49 desenvolvimento-tempo de desenvolvimento das diferentes fases até a fase adulta foi  
50  
51 registrado em dias. **Resultados e conclusões:** O período médio de incubação dos ovos  
52  
53 foi 22,7 dias. Primeira refeição ocorreu 3,13 dias após eclosão. Período de intermuda foi  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 maior em N5-adulto 193,43. A média de alimentação durante período ninfal foi 13,4.  
4  
5 Resistência ao jejum-indicou que ninfas de 3°, 4° e 5° estágios apresentam maior  
6  
7 resistência que adultos. A taxa de mortalidade mais alta foi registrada em N3 (22,2%).  
8  
9 A sobrevivência média de adultos foi 25,6 semanas. A média total do ciclo de vida foi  
10  
11 503,4 dias. Este é o primeiro relato sobre a biologia de *T. carvalhoi* alimentadas com  
12  
13 camundongos. Ampliamos o conhecimento bionômico desta espécie, além de contribuir  
14  
15 para o controle das colônias e entender a possível participação na transmissão do *T.*  
16  
17 *cruzi*.  
18  
19

20  
21  
22  
23 *Palavras-chaves:* Triatominae. *Triatoma carvalhoi*. Comportamento biológico.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

## 32 INTRODUÇÃO

33  
34  
35  
36  
37

38 No estado brasileiro do Rio Grande do Sul há 11 espécies de triatomíneos,  
39  
40 incluindo espécies introduzidas, de hábitos sinantrópicos, associados aos ninhos de aves  
41  
42 ou mamíferos, hábitos rochosos, considerados autóctones<sup>1</sup> e dispersos de forma  
43  
44 descontínua pelo Estado, alguns restrito ao centro-sul, outros ao noroeste e nordeste.  
45  
46 Entre as espécies selvagens, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) é o vetor mais  
47  
48 importante em termos epidemiológicos, devido à sua ampla distribuição geográfica e  
49  
50 capacidade de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, seguido por *Triatoma carvalhoi*  
51  
52 Jurberg, Rocha & Lent, 1998 e *Triatoma circummaculata* (Stål , 1859). Estas espécies  
53  
54 são simpátricas, vivem em ambientes rochosos e seus hábitos alimentares são muito  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 ecléticos mostrando intervalos irregulares em seu ciclo biológico<sup>2</sup>. Atualmente, os  
4 dados de campo mostraram que *T. rubrovaria* é frequentemente encontrado em áreas  
5 domiciliares e peridomiciliares<sup>3</sup>. Apenas *T. carcavalloi* é registrado em Canguçu, Dom  
6 Feliciano, Pinheiro Machado, São Jerônimo<sup>4</sup> (Fonte: IPB-LACEN/RS) e *T. carvalloi*  
7 tem sido encontrado dentro de domicílios neste estado<sup>5,6</sup>.

8  
9 Observações morfológicas inclui *T. carcavalloi* no grupamento de espécies  
10 semelhantes do “complexo infestans”, no “subcomplexo rubrovaria”<sup>7</sup>.

11  
12 Aspectos da biologia de espécies silvestres são importantes para avaliar a  
13 eficiência destes insetos como vetores de *T. cruzi*, e também por estas espécies  
14 invadirem constantemente ambientes sujeitos a modificações humanas.

15  
16 O ciclo de vida dos triatomíneos varia de acordo com a espécie, as condições  
17 ambientais e a disponibilidade de fontes adequadas de sangue<sup>8,9</sup>.

18  
19 A resistência ao jejum pode ser de grande importância pois afeta diretamente as  
20 campanhas de controle de vetores<sup>10</sup>. A tolerância a longos períodos de jejum favorece a  
21 sua capacidade de sobreviver a períodos difíceis da escassez de alimentos, quando estes  
22 animais se escondem em frestas de paredes e escapam de inseticidas residuais<sup>11</sup>; então  
23 eles são capazes de colonizar o domicílio novamente.

24  
25 É essencial o conhecimento das características biológicas dos insetos para  
26 designar as estratégias de controle, principalmente nos vetores secundários com  
27 potencial para estabelecer em habitações humanas<sup>12</sup>.

28  
29 O objetivo deste estudo foi conhecer os parâmetros bionômicos de *Triatoma*  
30 *carcavalloi* em condições laboratoriais estudando o período de incubação, a fertilidade,  
31 a primeira refeição de ninfas de primeiro estágio, período de intermuda, número de  
32 refeições sanguíneas, resistência ao jejum, mortalidade, longevidade e ciclo de  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

desenvolvimento, para entender melhor a sua capacidade potencial como vetor e usar esse conhecimento para monitorar esta espécie durante as ações de controle.

## MÉTODOS

Os espécimes de *T. carcavalloii* foram coletados no estado do Rio Grande do Sul, em Encruzilhada do Sul (30°32'38"S;52°31'19"O), mais especificamente em Cordilheira, nos ecótopos naturais e no peridomicílio. Os insetos foram mantidos a 26°C e 70%UR.

**Fertilidade** - 16 fêmeas foram separadas individualmente em tubos de Borrel, fechados com rede de nylon e observadas diariamente, verificando a coloração dos ovos, se eclodem ou não. A oviposição destas fêmeas iniciaram depois do primeiro repasto.

**Período de incubação** - 60 ovos de oito fêmeas foram separadas em tubos de Borrel fechados com rede de nylon, de acordo com a data de postura e observados diariamente até a eclosão.

**Primeiro repasto** - 30 ovos foram individualizados em cada tubo de Borrel. Após a eclosão, uma refeição de sangue foi oferecida a cada ninfa até 10 minutos. Camundongos suíços foram usados (Protocolo CEUA-FIOCRUZ LW-14).

**Período de intermuda** - 50 ninfas de cada estágio, 15 machos e 15 fêmeas foram separadas e colocadas em recipientes de plástico individuais (5.5 cm diâmetro x 10.5 cm altura) com o mesmo dia de eclosão ou ecdise. Papel de filtro foi utilizado para cobrir a superfície do recipiente. Os espécimes foram observados diariamente até as

1  
2  
3 ecdises dos próximos estágios. O período de intermuda considerado foi o número de  
4  
5 dias entre duas ecdises consecutivas.  
6

7 **Número de refeições sanguíneas** - quantificados o número de refeições  
8  
9 sanguíneas para cada estágio ninfal. A refeição sanguínea ocorreu uma vez por semana  
10  
11 até a repleção.  
12

13  
14 **Resistência ao jejum** - foi considerado o período compreendido entre a ecdise e  
15  
16 a morte do inseto. Os insetos foram alimentados em camundongos (*Mus musculus*)  
17  
18 semanalmente, por um período de 60 – 80 minutos. Após a ecdise, as ninfas foram  
19  
20 separadas de acordo com cada estágio (N = 50) e adultos (N = 30), acondicionados em  
21  
22 tubos de Borrel, com o mesmo dia de ecdise, e observados diariamente até a morte.  
23  
24

25 **Mortalidade** - 177 ninfas de 1º estágio foram separadas e foi calculada de  
26  
27 acordo com cada estágio de ninfa mudada até o adulto, considerando as mortes.  
28

29 **Longevidade** - considerado o tempo decorrido desde cada muda para o estágio  
30  
31 adulto até a sua morte.  
32  
33

34 **Ciclo de desenvolvimento** - os 60 ovos postos por fêmeas de campo de *T.*  
35  
36 *carcavalloii* foram selecionados aleatoriamente e colocados individualmente em  
37  
38 recipientes de plástico, com papel de filtro dentro para proporcionar aos insetos em  
39  
40 desenvolvimento o acesso à fonte de alimento. Cada recipiente foi numerado e  
41  
42 examinados diariamente até a eclosão dos ovos. As ninfas foram observadas todos os  
43  
44 dias e alimentadas semanalmente em camundongos até a repleção e o tempo para passar  
45  
46 pelos diferentes estágios até à idade adulta foi registrado em dias. O tempo de  
47  
48 desenvolvimento (total e por estágio) foram expressos em valores médios  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTADOS

Fertilidade – a primeira oviposição ocorreu em 6 dias. O número médio de ovos/semana foi 30. O maior número de ovos/semana foi observado durante os meses mais quentes. É importante mencionar que os ovos que não eclodiram eram férteis, pois a coloração foi a mesma para todos, rosa claro e sua cor se tornou vermelha de acordo com o processo de embriogênese. Os ovos têm a forma elipsóide e são presos ao substrato.

Período de incubação – a média do período de incubação dos espécimes foi 22.7 dias, com o mínimo de 21 e o máximo de 26 dias. Dos 60 ovos, 38.3% eclodiram (**Tabela I**).

Primeiro repasto – as ninfas de primeiro estágio obtiveram uma média de 24 dias e em outros estágios ninfais uma média de 3,13 dias para o primeiro dia de refeição sanguínea, com um mínimo de um dia e um máximo de cinco dias, mas a maioria eram dois ou quatro dias.

Período de intermuda – das 50 ninfas utilizadas, oito morreram antes de atingir a fase adulta: três N1, quatro N2 e uma N3. O período de intermuda mais curto foi observado entre ninfas de 1º/2º estágios (18.52 dias) e o maior entre o 5º estágio/adulto (193.43 dias) (**Tabela II**). Observou-se que ninfas de 5º estágio exigem várias refeições sanguíneas, a fim de realizar a muda, o que acontece depois de mais de um ano.

Número de refeições sanguíneas – o número mínimo ocorreu em fêmeas e machos com zero e um, respectivamente, e o número máximo em ninfas de 5º estágio com 42. A média geral de alimentações durante todo o desenvolvimento ninfal foi de 13,4 (**Gráfico 1**).

1  
2  
3 Resistência ao jejum – as ninfas de 3°, 4° e 5° estágios apresentaram mais  
4  
5 resistência que os adultos. Os machos mostraram dados semelhantes as ninfas de  
6  
7 primeiro e segundo estágios, sendo em geral, menos resistente do que as fêmeas (Tabela  
8  
9 III). O período total de observação foi de 8 meses.  
10

11 Mortalidade - Iniciamos com 177 ninfas de *T. carvalhoi* e somente 95  
12 atingiram a fase adulta (a taxa de mortalidade global foi de 57.2%). A mortalidade para  
13 cada estágio variou de 4,0 a 22,2% e a maior taxa de mortalidade foi registrada em N3  
14 (22,2%), seguida por N2 (14,0%) (Tabela IV).  
15  
16  
17  
18  
19

20 Longevidade - Os machos tiveram uma vida útil mais longa, sua sobrevivência  
21 média foi de 25,6 semanas (179,2 dias), já as fêmeas a média foi de 23,1 semanas  
22 (161,7 dias).  
23  
24  
25  
26

27 Ciclo de desenvolvimento – o ciclo de vida total em *T. carvalhoi* foi 503.4 dias  
28 (72 semanas) (Tabela V). Diferenças foram observadas em N5, onde a média de  
29 desenvolvimento foi de 193.43 (27 semanas).  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

## 40 DISCUSSÃO

41  
42  
43  
44 A importância de se estudar parâmetros bionômicos sobre os triatomíneos em  
45 condição de laboratório vem sendo destacada por diversos autores, seja para aumentar o  
46 conceito biológico de espécie, ou para melhorar as condições de criação em laboratório  
47 de diferentes vetores, independentemente de serem espécies de importância  
48 epidemiológica ou silvestre além de fornecer subsídios para os trabalhos de  
49 controle<sup>13,14,15,16</sup>.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 Em condições de laboratório, onde fatores abióticos são mais estáveis e  
4 alimentação regular, ciclos vitais são geralmente mais curtos<sup>17</sup>. No entanto, certas  
5 espécies podem apresentar um ciclo de vida maior, devido a diapausa de ninfas de 5º  
6 estágio, observada em algumas espécies silvestres<sup>18</sup>, como foi observado neste estudo  
7 em que as ninfas requerem várias refeições sanguíneas para realizarem a muda, que  
8 alonga esta fase até mais de um ano. O mesmo foi observado para *T. rubrovaria*, *T.*  
9 *carcavallo* e *T. circummaculata*<sup>19</sup>.

10  
11  
12 No primeiro estudo sobre o ciclo biológico de *T. carcavallo* em condições de  
13 laboratório foi usada uma alimentação em pombos, baratas e lagartos<sup>20</sup>. Outros autores  
14 estudaram o ciclo biológico de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* alimentados com  
15 hemolinfa de Blattodea (baratas), para avaliar o desenvolvimento ninfal<sup>21</sup>. Este estudo  
16 sugere que este tipo de alimento pode ser um processo natural para essas espécies de  
17 triatomíneos, e provavelmente representa uma forma de sobreviver em condições  
18 naturais. Dependência de hemolinfa é muito evidente em *T. circummaculata*, como eles  
19 não se desenvolvem no laboratório como ninfa de primeiro estágio (N1) se este tipo de  
20 alimento não estiver disponível<sup>1,22</sup>. Algumas espécies de triatomíneos possuem hábitos  
21 alimentares bastante ecléticos em condições naturais<sup>23</sup>.

22  
23  
24 O ciclo de vida de *Triatoma infestans*<sup>25</sup> e a resistência ao jejum de *Rhodnius*  
25 *prolixus*<sup>26</sup>, ambos trabalhos os autores estimaram que a refeição sanguínea representa  
26 uma condição essencial para oviposição em geral e fertilidade, em particular. Em  
27 *Triatoma rubrovaria* não sei se a baixa eclosão é devido a esse fator, porque os  
28 espécimes utilizados nos experimentos foram alimentados uma vez por semana durante  
29 uma hora, sem estabelecer o nível de sangue ingerido por cada indivíduo<sup>27</sup>. Já em  
30 nossos estudos, a alimentação foi padronizada, *T. carcavallo* foi alimentado com  
31 camundongos uma vez por semana até a repleção, por isso não podemos dizer que a  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 baixa eclosão é devido a alimentação ou outros fatores, tais como pequenas variações  
4  
5 de temperatura e umidade durante o experimento.  
6

7 A incidência de eclosão dos ovos varia entre espécies do gênero *Triatoma*, e  
8  
9 mesmo dentro de uma mesma espécie. Em *Triatoma carcavalloi*, a taxa de eclosão foi  
10  
11 38,3%, considerada baixa quando comparada com *T. flavida*, que apresentou 93% dos  
12  
13 ovos eclodidos<sup>28</sup>, com *T. pseudomaculata* onde a taxa foi de 88,3%<sup>29</sup> e um intervalo de  
14  
15 60 a 80% para *T. rubrovaria*<sup>30</sup>, *T. dimidiata*<sup>31</sup>, *T. infestans*<sup>32</sup>, *T. maculata*<sup>33</sup>, *T.*  
16  
17 *rubrofasciata*<sup>34</sup> e *T. pallidipennis*<sup>35</sup>. No caso do gênero *Rhodnius* a temperatura foi  
18  
19 observada e influencia não apenas no período de incubação, mas também na incidência  
20  
21 de eclosão dos ovos, como mostrado por *R. robustus*<sup>36</sup>.  
22  
23

24 A média do período de incubação dos ovos em *T. rubrovaria* foi 24,84 dias<sup>27</sup>, já  
25  
26 em nossos estudos o período de incubação para *T. carcavalloi* foi 22.7 dias.  
27  
28

29 Neste estudo, a busca para a primeira refeição das ninfas de *T. carcavalloi*  
30  
31 resultou em maior frequência nos dias 2 e 4, semelhantes aos resultados de *T.*  
32  
33 *pseudomaculata*<sup>29</sup> e diferentes para *T. vitticeps* o que mostra uma preferência pelos 3°,  
34  
35 6° e 10° dias<sup>37</sup>.  
36  
37

38 É importante cuidar dos triatomíneos recém alimentados, porque o manuseio  
39  
40 inadequado é a principal causa de mortalidade em uma criação<sup>17,38</sup>.  
41  
42

43 O ciclo de *T. carcavalloi* precisa de um número médio de 13,4 refeições  
44  
45 sanguíneas, maior que o observado para *T. rubrovaria* - 11,1<sup>39</sup>, por *T. vitticeps* - 8<sup>37</sup> e  
46  
47 para *T. brasiliensis* - 11<sup>40</sup> e menor que *T. pseudomaculata* - 14,7<sup>29</sup>. Devemos considerar  
48  
49 que essas espécies vivem em habitats diferentes e com diferentes hábitos alimentares.  
50  
51 Fêmeas de *T. pseudomaculata* para compensar a menor quantidade de sangue ingerido,  
52  
53 procurou a fonte de alimento em um curto espaço de tempo, e executou um número  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 maior de refeições sanguíneas<sup>29</sup>. Já ninfas de 5º estágio de *T. carcavalloii* realiza vários  
4  
5 refeições antes de realizar a ecdise.  
6

7 A média do período intermuda de ninfas de segundo estágio (N2) de *T.*  
8 *rubrovaria* foi maior do que para a as ninfas de terceiro estágio (N3)<sup>39</sup>. Em *T.*  
9 *brasiliensis*, em condições de temperatura padrão, tendem a mostrar uma escala  
10 crescente de períodos intermuda de N1 a N5<sup>17,15</sup>, corroborando com nossos estudos.  
11  
12  
13  
14  
15

16 O período de resistência ao jejum para *T. carcavalloii* aumentou a partir do 1º ao  
17 5º estágio ninfal. Durante a fase adulta, machos exibiram menor resistência em  
18 comparação com as fêmeas, corroborando os dados obtidos com uma temperatura de  
19 30°C para *T. rubrovaria*<sup>17</sup> e para *T. sordida*<sup>42</sup>. Estes resultados não estão em  
20 consonância com os obtidos em *T. vitticeps*<sup>41</sup> e *T. rubrovaria*<sup>43</sup>, que demonstraram  
21 maior resistência ao jejum em machos. Ninfas toleraram períodos de jejum maior do  
22 que adultos<sup>18</sup> confirmando nossos estudos. Entretanto, esta menor resistência dos  
23 adultos pode ser compensada pela maior capacidade de dispersão<sup>26</sup>.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

34 A eficácia das campanhas de controle de vetores tem sido prejudicada pela  
35 resistência ao jejum<sup>41</sup>, pois permite que esses animais permaneçam em seus abrigos,  
36 livre de inseticidas e às vezes até mesmo de seus efeitos residuais, aumentando assim a  
37 possibilidade de nova colonização pelos indivíduos restantes<sup>45,46,14,47,11,43,48</sup>.  
38  
39  
40  
41  
42

43 A taxa de mortalidade foi mais alta em ninfas de terceiro estágio de *Triatoma*  
44 *rubrovaria*<sup>12</sup>, corroborando os nossos estudos em que a taxa foi de 22.2%. Ninfas de *T.*  
45 *infestans* quando alimentadas em intervalos mais longos a taxa de mortalidade  
46 aumentou, comprovando a influência da alimentação sobre a mortalidade ninfal<sup>44,25</sup>.  
47  
48  
49  
50  
51

52 Nossos resultados para longevidade constataram que os machos sobrevivem  
53 mais que as fêmeas corroborando com os estudos realizados em *T.*  
54 *rubrovaria*<sup>16,17,24,27,30,12</sup> e *T. rubrofasciata*<sup>34</sup>. A longevidade da fêmea de *T. carcavalloii*  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 foi maior quando alimentada com pombos, sugerindo uma provável influência da  
4  
5 alimentação<sup>19</sup>.  
6

7 O ciclo de desenvolvimento das ninfas de quinto estágio de *T. carcavalloi*  
8 alimentados em pombos foi em média 259,67 dias<sup>19</sup>, diferentes do nosso trabalho em  
9 que os insetos foram alimentados em camundongos e a média foi de 193,43 dias. O  
10 ciclo total de vida em *T. rubrovaria* foi 300 dias<sup>30</sup>, já em nossos estudos, o ciclo foi  
11 maior em *T. carcavalloi*, 503,4 dias.  
12  
13

14 A influência da temperatura (25°C e 30°C) em *T. rubrovaria* foi também  
15 estudada e observou um desenvolvimento mais rápido em 30°C<sup>17</sup>. No presente estudo,  
16 as temperaturas iguais ou superiores a 28°C, também influenciaram o desenvolvimento  
17 de *T. carcavalloi*, encurtando o seu ciclo de vida.  
18  
19

20 Nossos resultados sugerem que características biológicas são critérios  
21 importantes para determinar a relação entre as espécies *Triatoma carcavalloi*, *Triatoma*  
22 *circummaculata* e *Triatoma rubrovaria*, coletados nos domicílios do Rio Grande do Sul,  
23 Brasil.  
24  
25

26 A capacidade de transmissão da doença de Chagas mostrada por *T. carcavalloi*  
27 é tão elevada quanto a de *T. rubrovaria*, enquanto *T. circummaculata* se infecta menos<sup>1</sup>.  
28 Provavelmente, isso ocorre devido ao fato de *T. circummaculata* se alimentar com  
29 menos frequência em mamíferos. Estes dados, juntamente com os resultados deste  
30 estudo mostram a necessidade de vigilância epidemiológica constante de *T. carcavalloi*.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## 51 AGRADECIMENTOS

52 A Dra. Célia Lammerhist and MSc. Cleonara Bedin pelo fornecimento de  
53 triatomíneos provenientes do campo.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

### SUPORTE FINANCEIRO

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).*

### REFERÊNCIAS

1. Ruas-Neto AL, Corseuil E. Hábitos, Distribuição Geográfica e Potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Entomol y Vect* 2002; 9 (2): 231-249.
2. Cardozo-de-Almeida MAR. Estudos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais em cinco espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (HEMIPTERA:REDUVIIDAE:TRIATOMINAE) incluindo a biologia de *Triatoma carcavalloei*. [Dissertação], Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007; 102p.
3. Costa J, Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (Supl. I): 46-51.
4. Bedin C, Mello F, Wilhelms TS, Torres MA, Estima C, Ferreira CF, Sehn L. Vigilância Ambiental: Doença de Chagas no Rio Grande do Sul. *Bol Epidemiológico* 2009; 11 (3): 8.

- 1  
2  
3 5. Martins LP, Castanho RE, Casanova C, Caravelas DT, Frias GT, Ruas-Neto AL,  
4  
5 Rosa JA. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em  
6  
7 Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 39: 198-202.  
8  
9
- 10 6. Jurberg J, Rocha DS, Lorosa ES, Vinhaes MC, Lent H. Uma nova espécie de  
11  
12 *Triatoma* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae,  
13  
14 Triatominae). Entomol y Vect 1998; 5: 295-310.  
15  
16
- 17 7. Costa J, Peterson AT, Dujardin JP. Morphological evidence suggests homoploid  
18  
19 hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera:  
20  
21 Heteroptera: Reduviidae). Infect Genet Evol 2009; 9: 263-270.  
22  
23
- 24 8. Schofield CJ. Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. Ann Soc Belge  
25  
26 Med Trop 1985; 65: 149-164.  
27  
28
- 29 9. Carbajal de la Fuente AL, Cunha V, Rocha NL, Lopes CM, Noireau F. Comparative  
30  
31 biology of the two sister species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Rev Soc Bras  
32  
33 Med Trop 2010; 43: 15-18.  
34  
35
- 36 10. Moreira CJC, Spata MCD. Dynamics of evolution and resistance to starvation of  
37  
38 *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Reduviidae: Triatominae), submitted to two different  
39  
40 regimens of food deprivation. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97 (7): 1049-1055.  
41  
42
- 43 11. Cabello DR. Resistance to Starvation of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera:  
44  
45 Reduviidae: Triatominae) under Experimental Conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz  
46  
47 2001; 96 (4): 587-591.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 12. Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano AMF. Estadísticos poblacionales  
4 de *Triatoma rubrovaria* en condiciones de laboratorio. Rev Saúde Pública 2005; 39 (2):  
5 211-216.  
6  
7  
8  
9  
10 13. Rocha DS, Galvão C, Jurberg J. Biología do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em  
11 condições de laboratorio (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo  
12 Cruz 1994; 89: 265- 270.  
13  
14  
15 14. Galvão C, Jurberg J, Lent H. Resistência ao jejum de *Triatoma nitida* Usinger, 1939  
16 em laboratorio (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 639-640.  
17  
18  
19 15. Costa J, Marchon-Silva V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes  
20 populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae,  
21 Triatominae). Entomol y Vect 1998; 5 (1): 23-34.  
22  
23  
24 16. Rodrigues VLCC, Filho ANF, Silva EOR. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843):  
25 tábua das ninfas, duração das formas e oviposição das fêmeas. Rev Soc Bras Med Trop  
26 38 2005; (3): 251-254.  
27  
28  
29 17. Silva IG. Influência da temperatura na biología de 18 espécies de triatomíneos  
30 (Hemiptera: Reduviidae) e no xenodiagnóstico. [Thesis], Universidade Federal do  
31 Paraná, 1985; 169p.  
32  
33  
34 18. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and  
35 their significance as vectors of Chagas' disease. Bull American Mus Nat Hist 1979;  
36 163: 125-520.  
37  
38  
39 19. Ruas-Neto AL. Aspectos morfológicos, distribuição geográfica, hábitos e  
40 importância vetorial de *Triatoma carvalhoi* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, *Triatoma*  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 *circummaculata* (Stal, 1859) e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), triatomíneos  
4 rupestres do Rio Grande do Sul (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). [Thesis],  
5 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2002; 108p.  
6  
7

8  
9  
10 20. Ruas-Neto AL, Corseuil E, Cavalleri A. Development of rupestrian triatomines  
11 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following hemolymphagy on blaberids  
12 (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. Entomol y Vect 2001; 8 (2):  
13 205-216.  
14  
15  
16  
17

18  
19  
20 21. Lorosa ES, Jurberg J, Souza ALA, Vinhaes MC, Nunes IM. Hemolinfa de  
21 Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria*  
22 (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae,  
23 Triatominae). Entomol y Vect 2000a; 7 (3): 287-296.  
24  
25  
26  
27

28  
29  
30 22. Martins LPA, Castanho REP, Casanova C, Caravelas DT, Frias GT, Ruas-Neto, AL,  
31 Rosa JA. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em  
32 Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39 (2): 198-202.  
33  
34  
35  
36

37  
38 23. Lorosa ES, Nunes IM, Vinhaes MC, Esteves-de-Andrade R, Jurberg J. Preferência  
39 alimentar de algumas espécies de Triatomíneos capturados no estado do Rio Grande do  
40 Sul, Brasil, com auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. Entomol y  
41 Vect 2000b; 7 (2): 211-225.  
42  
43  
44  
45

46  
47 24. Di Primio R. Sobre o *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) no Rio Grande do Sul.  
48 Rev Med Rio Grande do Sul 1953; 402-408.  
49  
50

51  
52  
53 25. Perlowagora-Szumlewicz A. Estudos sobre a biologia do *Triatoma infestans*, o  
54 principal vetor da doença de Chagas no Brasil (importância de algumas de suas  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 características biológicas no planejamento de esquemas de combate a esse vetor). Rev  
4 Bras Malariol D Trop 1969; 21: 117-159.

5  
6  
7  
8 26. Feliciangeli D, Rabinovich J, Fernandez E. Resistencia al ayuno em triatomins  
9 (Hemiptera, Reduviidae) Venezolanos. I. *Rhodnius prolixus* Stal. Rev Inst Trop São  
10 Paulo 1980; 22: 53-61.

11  
12  
13  
14 27. Argüello NV, Mischis CC, Civitta G, Bonino EE. Ciclo biológico de *Triatoma*  
15 *rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Reduviidae, Triatominae) en laboratório. Rev Bras Zool  
16 1988; 5(2): 245-251.

17  
18  
19  
20 28. Cabello DR, Lizano E. Biology of *Triatoma flavida* Neiva, 1911 (Hemiptera:  
21 Reduviidae) under Laboratory Conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96 (6): 879-  
22 881.

23  
24  
25  
26 29. Gonçalves TCM, Cunha V, Oliveira E, Jurberg J. Alguns aspectos da biologia de  
27 *Triatoma pseudomaculata* Côrrea & Espinola, 1964, em condições de laboratório  
28 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92 (2): 275-280.

29  
30  
31  
32 30. Damborsky MP, Bar ME, Gorla D. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma*  
33 *rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) under constant and fluctuating  
34 conditions of temperature and humidity. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38(5): 433-437.

35  
36  
37  
38 31. Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelder JC. Biology and ethology of  
39 *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance  
40 to starvation, and size of adults. J Med Entomol 1970; 7: 313-319.

41  
42  
43  
44 32. Rabinovich JE. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under  
45 laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. J Med Ent 1972; 9: 351-370.

- 1  
2  
3 33. Feliciangeli MD, Rabinovich J. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera:  
4 Reduviidae) under laboratory conditions. II. *Triatoma maculata*. J Med Entomol 1985;  
5 22: 43-48.  
6  
7  
8  
9  
10 34. Braga MV, Pinto ZT, Lima MM. Life cycle and reproductive patterns of *Tiatoma*  
11 *rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions.  
12 Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93 (4): 539-542.  
13  
14  
15  
16  
17  
18 35. Martínez-Ibarra JA, Katthain-Duchateau G. Biology of *Triatoma pallidipennis* (Stal,  
19 1872) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Mem Inst  
20 Oswaldo Cruz 1999; 94 (6): 837-840.  
21  
22  
23  
24  
25  
26 36. Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Presgrave OAF, Cunha V, Galvão C.  
27 Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*.  
28 Rev Saude Pub 2001; 35 (4): 400-406.  
29  
30  
31  
32  
33 37. Gonçalves TCM, Victorio VNM, Jurberg J, Cunha V. Biologia do *Triatoma*  
34 *vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)  
35 I. Ciclo evolutivo. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83: 519-523.  
36  
37  
38  
39  
40  
41 38. Gomes AB, Silva IG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XXI.  
42 *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae). Rev  
43 Patol Trop 2000; 29: 85-93.  
44  
45  
46  
47  
48  
49 39. Almeida CE, Folly-Ramos E, Agapito-Souza R, Magno-Esperança G, Pacheco RS,  
50 Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Tiratominae)  
51 IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;  
52 100 (3): 231-235.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 40. Soares RP, Evangelista LG, Laranja LS, Diotaiuti L. Population dynamics and  
4 feeding behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, main vectors  
5 of Chagas disease in Northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 151-155.  
6  
7  
8  
9  
10 41. Gonçalves TCM, Victorio VMN, Jurberg J, Cunha V. Biologia do *Triatoma*  
11 *vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)  
12 I. Resistência ao jejum. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84 (1): 131-134.  
13  
14  
15  
16  
17 42. Juarez E, Silva EPC. Comportamento do *Triatoma sordida* em condições de  
18 laboratório. Rev Saúde Pub 1982; 16 (supl): 1-35.  
19  
20  
21  
22  
23 43. Almeida CE, Francischetti CN, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria*  
24 (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: Patterns of feeding,  
25 defecation and resistance to starvation. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (3): 761-768.  
26  
27  
28  
29  
30 44. Perlowagora-Szumlewicz A. Ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* em condições de  
31 laboratório. Rev Bras Malar 1953; 5: 35-47.  
32  
33  
34  
35  
36 45. Dias JCP. Observações sobre o comportamento de triatomíneos brasileiros frente ao  
37 jejum, em laboratório. Rev Bras Malariol D Trop 1965; 17: 55-63.  
38  
39  
40  
41 46. Costa MJ, Perondini ALP. Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. Rev  
42 Saúde Pub São Paulo 1973; 7: 207-217.  
43  
44  
45  
46  
47 47. Cortéz MGR, Gonçalves TCM. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata*  
48 (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).  
49 Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93 (4): 549-554.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 48. Cailleaux SRP, Cunha V, Verly S, Junior VDL, Jurberg J. Resistência ao jejum de  
4  
5 *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em  
6  
7 condições de laboratório. Rev Pan-Amaz Saúde 2001; 2 (2): 39-43.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

Tabela I: Período de incubação dos ovos de *Triatoma carcavalloi*.

Oviposição	Quantidade total de ovos/dia	Ovos eclodidos	% ovos eclodidos	Período de incubação (dias)
1 <sup>a</sup>	10	03	40.0%	24
		01		26
2 <sup>a</sup>	10	01	20.0%	21
		01		23
3 <sup>a</sup>	17	04	41.1%	21
		01		23
		03		24
4 <sup>a</sup>	01	-	0%	-
5 <sup>a</sup>	20	03	40.0%	21
		03		22
		01		23
		01		25
6 <sup>a</sup>	02	01	50.0%	23
TOTAL	60	23	38.33%	-

Tabela II – Período de intermuda de *Triatoma carcavalloi*.

Estágio	N	Duração em dias			DP	S <sup>2</sup>
		Mínimo	Máximo	Média		
1°	50	15	24	18.52	2.34	5.48
2°	47	25	95	62.77	18.45	340.31
3°	43	44	138	86.93	19.00	361.02
4°	42	55	189	119.05	36.38	1323.27
5°	42	59	295	193.43	70.33	4946.11

N = n° ninfas ; DP = desvio padrão; S<sup>2</sup> = variância

For Review Only

**Tabela III – Resistência ao jejum de *Triatoma carvalhoi* (dias).**

<b>Estágio</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>S<sup>2</sup></b>
<b>N1</b>	50	15	59	37	15.52	240.73
<b>N2</b>	50	10	116	50	29.72	883.47
<b>N3</b>	50	03	128	65.5	37.54	1409.48
<b>N4</b>	50	58	210	134	54.25	2943.02
<b>N5</b>	50	07	185	146	43.08	1855.92
♀	30	21	81	61	18.30	334.83
♂	30	04	81	42.5	18.24	332.74

DP = desvio padrão; S<sup>2</sup> = variância

For Review Only

**Tabela IV – Mortalidade de *Triatoma carcavalloi*.**

<b>Estágio</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>Mortalidade %</b>	<b>Mortalidade cumulativa%</b>
<b>N1</b>	177	157	11.3	11.3
<b>N2</b>	157	135	14.0	25.3
<b>N3</b>	135	105	22.2	47.5
<b>N4</b>	105	99	5.7	53.2
<b>N5</b>	99	95	4.0	57.2

n = número de ninfas mudadas para o estágio seguinte

For Review Only



Tabela V – Ciclo de desenvolvimento em *Triatoma caracavallo*.

Estágio	N	Média (days)	Quantiles 25 a 75 %
Ovo	60	22.7	21 - 26
N1	50	18.52	15 - 24
N2	47	62.77	25 -95
N3	43	86.93	44 - 138
N4	42	119.05	55 - 189
N5	42	193.43	59 - 295
Total	42	503.4	219 - 757

For Review Only

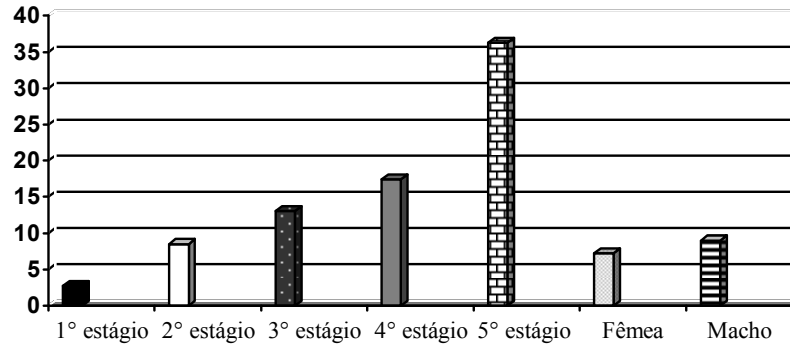


Gráfico 1 – Número de refeições sanguíneas de acordo com cada estágio ninfal em *Triatoma carvalhoi*.

## 2.1. Capítulo 5

**CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR, ALMEIDA CE, TEVES-NEVES SC, GONÇALVES TCM, SANTOS-MALLET J. Caracterização da búcula, rostro e sulco estridulatório, escutelo e genitália feminina de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavalloei* Juberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stal, 1895) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae).**

**Em preparação.**

**Caracterização da búcua, rostro, sulco estridulatório, escutelo e genitália externa feminina de *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma carcavallo* e *Triatoma circummaculata* (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae)**

Margareth Cardozo-de-Almeida<sup>1,2</sup>, Carlos E Almeida<sup>3</sup>, Simone C Teves-Neves<sup>1</sup>,  
Teresa C M Gonçalves<sup>1</sup>, Jacenir R dos Santos-Mallet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense, Pavilhão Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ Brasil, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRRJ, Br 465 Km 07, 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil

ABSTRACT. Morphostructural analysis of the ventral region of the head (rostrum, buccula and stridulatorium sulcus), scutellum and external female genitalia of adults of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859), are described in here. Morphological differences in the analyzed structures for all three *Triatoma* species studied were detected under scanning electron microscopy, confirming their grouping in “subcomplex rubrovaria” by their morphological similarities.

PALAVRAS CHAVES: Morfologia, “subcomplex rubrovaria”

## INTRODUÇÃO

Chagas é uma doença endêmica em 21 países das Américas e seu principal mecanismo de transmissão é a vetorial (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2012). Esta doença é principalmente transmitida através das fezes dos triatomíneos. Estes insetos têm como característica biológica principal a hematofagia obrigatório em todas as fases de ninfa e adulto (CARDOZO-DE-ALMEIDA, 2007)

Atualmente, a subfamília Triatominae Jeannel, 1919 é composta por 144 espécies (ROCHA, 2009; ROSA *et al.* 2012). No Brasil, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) é a espécie mais importante em termos epidemiológicos no Estado do Rio Grande do Sul, devido à sua ampla distribuição geográfica nesse estado, seguido por *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 e *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859). Essas espécies têm hábitos silvestres, vivem em simpatria e invadem o domicílio humano com frequência, devido às mudanças de ambientes produzidos por atividades

antrópicas (ALMEIDA *et al.* 2000; RODRIGUES *et al.* 2005), além da eliminação de *T. infestans* do domicílio que deixa um nicho vazio e disponível.

LENT & WYGODZINSKY (1979) mencionaram que a taxonomia de Triatominae é baseada nos caracteres morfológicos externos e indicaram a importância taxonômica do sulco estridulatório, o qual varia na forma, no comprimento, número e no espaço dos sulcos. A importância do rostro nesta subfamília tem sido sublinhada desde os anos 20 e 30 por PINTO (1931).

Segundo CARCAVALLO & GALÍNDEZ-GIRÓN (1995), o gênero *Triatoma* apresenta padrões específicos no escutelo, não só na forma e comprimento, mas também na estrutura cuticular, central, depressões, projeções, processos que permitem a sua utilização na diferenciação das espécies. CARCAVALLO *et al.* (1996) usaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para ver os detalhes na forma e proporções do escutelo em *Triatoma ryckmani*. Através da MEV, GALÍNDEZ-GIRÓN *et al.* (1997) caracterizaram o escutelo de *Triatoma guazu*. OBARA *et al.* (2007) utilizaram também a MEV para estudar o escutelo de oito espécies do gênero *Triatoma*.

A genitália externa das fêmeas foi questionada na década de 60 mas recentemente foi estudada por ROSA *et al.* (2010), onde utilizou a MEV para caracterizar seis espécies de Triatominae. Logo depois, ROSA *et al.* (2011) utilizou esta mesma abordagem para o gênero *Rhodnius*, onde possibilitou a separação de 12 espécies e TEVES-NEVES (2012) também usou a MEV para descrever a morfologia externa da genitália das fêmeas de *T. costalimai* e *T. williami*.

Esta é a primeira descrição morfológica da búcula, rostro, sulco estridulatório, escutelo e genitália externa feminina em adultos de *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* e *T. circummaculata* utilizando MEV.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os insetos utilizados neste estudo foram obtidos de colônias de laboratório mantidas no Setor de Entomologia Médica e Forense, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz. As colônias foram iniciadas com espécimes coletadas no campo e domicílios do Município de Encruzilhada do Sul, RS (30°32'38"S; 52°31'19"O).

Para análise ultraestrutural dos insetos foram removidos com bisturi o escutelo, o 6º segmento abdominal contendo a genitália externa feminina e cinco cabeças com búcua, rostro e parte do tórax (proesterno) contendo o sulco estridulatório de *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* e *T. circummaculata*. Estas estruturas foram lavadas em água destilada, desidratadas em série alcoólica crescente nas concentrações de 7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes em 100% por imersão durante 10 minutos em cada concentração. As estruturas foram montadas em suportes metálicos com diâmetro de 1,2 cm aderidas a uma fita dupla face adesiva e deixadas em estufa a 60° por 2 horas para secagem e em dessecador contendo sílica gel até a metalização. As estruturas depois de secas foram pulverizadas com ouro e mais tarde observadas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM6390 LV) da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz. As imagens foram captadas digitalmente para um computador e processadas com o Adobe Photo Shop CS3 português 10,0 software.

## RESULTADOS

### 1. Búcua, rostro e sulco estridulatório

A búcua de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* está localizada na região posterior do rostro e com uma borda grossa na região anterior e superfície granular. Nas três espécies, a região anterior mostrou acentuadas pregas, tanto nas fêmeas quanto nos machos. A búcua de *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* é em forma de “U” (Figs. 1A e 3A) e de *T. circummaculata* em forma de “V” (Fig. 2A). Em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* a área interna da região central apresentou uma fenda nas fêmeas, caráter ausente nos machos, e presente nas fêmeas e machos de *T. circummaculata*.

A análise ultra-estrutural do rostro foi semelhante em ambos os sexos nas três espécies. A placa apical tem um formato de losango na lamela inferior e na superior tem uma forma de dígitos. No ápice do rostro foram observadas duas fendas laterais 1 +1 (Figs. 1B, 2B e 3B).

O sulco estridulatório é em forma de "V" em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Figs. 1C e 3C) e em forma de “U” em *T. circummaculata* (Fig. 2C). Nas três espécies sua borda posterior atinge o primeiro par de pernas e a cavidade acetabular apresenta uma

depressão na região central, com estrias paralelas bem marcadas e delimitadas por papilas e sensilas. Esta estrutura é maior nas fêmeas que nos machos.

## 2. Escutelo

Forma geral do corpo - Todos os escutelos analisados tinham uma forma triangular (Fig. 2A, 2B, 2C).

Bordas laterais –*T. circummaculata* e *T. rubrovaria* apresentaram fortemente esculpidas e irregulares (Figuras 2B e 2C). Em *T. carcavalloi*, as bordas laterais também esculpidas fortemente porém regulares (Figura 2A).

Profundidade e forma da depressão central – Forma cordiforme (em forma de coração) em *T. circummaculata* (Fig. 2B). Já *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* têm uma depressão central, em forma de W (Fig. 2A e 2C).

A extensão da área da depressão central não atinge a base do processo posterior do escutelo nas três espécies.

Em *T. circummaculata*, a porção mediana da depressão central mostrou sulcos horizontais bem marcados, enquanto em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* tem rugosidade acentuada na depressão mediana mas os sulcos são mistos, entre horizontais e verticais.

Sensilas - Foram observadas em todos os escutelos que foram estudados, *T. circummaculata* mostra a maior concentração e abundância de sensilas tanto na superfície dorsal inteira quanto no posterior processo (Fig. 3B). As sensilas são menos abundantes em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Fig. 3A e 3C).

Processo posterior e ápice do escutelo - *T. carcavalloi* tem um processo posterior sub-cônico, estreito na base, com perceptíveis estrias transversais ao longo de todo o processo, incluindo o ápice (Fig. 2A). As sensilas são distribuídas aleatoriamente sobre estas áreas estriadas, entre a base e a extremidade, ao contrário de *T. circummaculata*, que possui sensilas somente na base e no ápice do processo posterior escutelar, e não exhibe tal sensilas no meio (Fig. 2A, 2B). O ápice do processo posterior escutelar é truncado (Fig. 2A).

Em *T. circummaculata*, o processo posterior é cilíndrico, longo, largo na base e sem estrias transversais em sua superfície (Fig. 2B). O ápice do processo posterior escutelar é um pouco arredado (Fig. 2B).

Em *T. rubrovaria*, o processo posterior é cilíndrico, largo na base, curto e pequeno atingindo o meio do corpo principal do escutelo, enquanto o ápice do processo

posterior do escutelo é claramente afunilado, cônico e com bastante estrias em forma de anéis transversais na base do processo posterior (Fig. 2C).

### 3. Genitália externa feminina

Vista ventral da genitália externa feminina – A parte depois do esternito VII, que constitui as estruturas genitais externos, é duas vezes maiores em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* que em *T. circummaculata*. A linha divisória entre o esternito VII e o par de gonocoxitos VIII tem maior curvatura em *T. rubrovaria* que em *T. carcavalloi* e *T. circummaculata*. Embora a forma do gonocoxito VIII seja semelhante em ambas as espécies, são maiores em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Figs. 4A e 4C).

Nas três espécies, os gonocoxitos VIII são largos e têm uma forma subtriangular. A altura do par do gonocoxito VIII é maior em *T. carcavalloi* quando comparado com *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*. Com respeito às larguras das bases, a proporção é de cerca de 2:1:2, respectivamente. A base da gonopofise VIII de *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* tem o formato em “V” no seu encontro com o gonocoxito VIII, o que difere de *T. circummaculata* que possui um formato mais “plano” na base do “V”. Existe uma diferença no comprimento das gonopofises VIII destas três espécies, em *T. circummaculata* é bem menor. Um par de gonopofises IX podem ser observados em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Figs. 4A e 4C) mas não em *T. circummaculata*.

As gonopofises VIII são subtriangulares em *T. circummaculata* e ambas são mais finas que em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria*. Nas três espécies, não foi observada diferença na forma dos gonocoxitos IX. Por outro lado, a vista ventral mostra uma diferença bastante perceptível quanto ao comprimento do gonocoxito IX: é bem menor em *T. circummaculata*. A vista ventral também mostra claramente as expansões laterais do esternito IX nas três espécies. Somente foi observada a presença do segmento X em *T. circummaculata*. (Fig. 4B).

Vista Lateral – As observações de MEV da vista lateral também mostram que nas três espécies, os gonocoxitos VIII são largos e têm uma forma subtriangular mas em *T. circummaculata* essa estrutura é bem menor (Fig. 5B), sendo o aumento de 55X enquanto nas outras duas espécies o aumento foi de 30X.

O esternito IX e o segmento X em *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* são flexionados para a porção ventral, indicando uma terminação abrupta e os gonocoxitos VIII são limitados ao esternito IX e segmento X (Figs. 5A, 5B e 5C).



Também na vista lateral, as três espécies diferem da forma que o esternito IX e o segmento X estão dispostos. O esternito IX está numa posição plana, enquanto que o segmento X está curvado ventralmente.

Vista posterior - Observação dos segmentos genitais femininos em amostras posicionado a um ângulo de 90 ° em MEV revelou que estes segmentos são maiores em *T. rubrovaria* e menores em *T. circummaculata*. Os gonocoxitos VIII de *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* são distintamente mais largos e mais baixos do que em *T. circummaculata*, o qual é mais estreito e mais alto. Nas três espécies as gonopófises VIII são externas e não ultrapassam a parte final do segmento X. Em *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, as gonopófises VIII tem uma forma triangular, o que não foi possível observar em *T. carcavalloi*. Os gonocoxitos IX são visíveis nas três espécies (Figs. 6A, 6B e 6C).

Em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria*, a vista posterior, também a 90°, mostra que existe uma linha divisória superficial que separam o tergito IX e o segmento X, o que não possível visualizar em *T. circummaculata*. Portanto, o tergitos IX e o segmento X parece uma única peça, cuja forma se assemelha a um triângulo equilátero nestas duas espécies. Nas partes terminais dos esternitos VII e IX e o gonocoxito VIII, existem 1 + 1 apêndices externos nas três espécies, estas estruturas são menores e não exteriorizadas. Na vista posterior, não há diferença entre os gonocoxitos VIII de *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria*, mas são maiores que em *T. circummaculata* (Fig. 6B).

Em *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, o tergito IX e o segmento X aparecem ligados à parte central e separados nas laterais (Figs. 6A, 6B e 6C).

## DISCUSSÃO

Considerando que *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* e *T. circummaculata* têm sido encontradas com frequência em domicílios nos municípios do Rio Grande do Sul (SANTOS-MALLET *et al.* 2009), foi realizado um estudo morfológico comparativo entre essas espécies através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Até a década de 1960, a taxonomia dos triatomíneos usava como critérios básicos, os caracteres morfológicos externos e cromáticos, mas durante a última década, a MEV

vem sendo usada como uma ferramenta importante para a sistemática de Triatominae, justificando o status de espécies crípticas e seus complexos (SILVA *et al.* 2003; GALVÃO *et al.* 2005).

LENT & WYGODZINSKY (1979), chamaram a atenção para a importância do sulco estridulatório pode ter sobre a identificação da espécie. A importância desta estrutura foi sublinhada por BARTH (1953) e sua funcionalidade por GALÍNDEZ-GIRÓN *et al.* (1998). GONÇALVES *et al.* (1985) concluiu que esta estrutura era apropriada para separar as espécies de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

Em nossos estudos o sulco estridulatório é em forma de “U” em *T. circummaculata* e em forma de “V” em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria*, assim como em *T. guazu* e *T. jurbergi* (SILVA *et al.* 2003), além de *T. klugi* e *T. vanda*e (SILVA *et al.* 2010).

As búculas, segundo SILVA *et al.* (2010) - *T. klugi* e *T. vanda*e e SILVA *et al.* (2003) - *T. guazu* e *T. jurbergi*, todas apresentaram a forma de “U”, conforme as búculas de *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* observadas em nossos estudos.

O rostro de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* apresentaram duas fendas laterais 1+1 no ápice, mesmo resultado encontrado em *T. jurbergi* (SILVA *et al.* 2003) e *T. klugi* (SILVA *et al.* 2010).

A região da depressão mediana do escutelo de *T. circummaculata* apresentou a forma codiforme (em forma de coração), o que corroborou com os estudos realizados por CARCAVALLO *et al.* (1997). Já *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* apresentaram a forma de W, assim como em *T. eratyrisiformis* (OBARA *et al.* 2007). LENT & WYGODZINSKY (1979) ilustraram a depressão mediana do escutelo em *T. eratyrisiformis* como uma forma mal definida.

Comparando os nossos resultados com os obtidos por OBARA *et al.* (2007), o escutelo de *T. vanda*e é bem parecido com o de *T. carcavalloi*, diferindo apenas na disposição das sensilas do processo posterior. *T. carcavalloi* não apresenta sensilas na região central.

OBARA *et al.* (2007) realizou uma análise morfológica do escutelo de oito espécies pertencentes ao gênero *Triatoma* e revelou características importantes, especialmente a forma da depressão mediana e o processo posterior escutelar. De todas as espécies estudadas por estes autores, quatro apresentaram a forma da depressão mediana codiforme. Esta forma parece ser uma característica genérica deste grupo, uma vez que de acordo com os dados da literatura em que a maioria das espécies analisadas,

até agora exibem este padrão. No entanto, algumas exceções foram encontradas, tais como em *T. tibiamaculata*, *T. eratyrisiformis* e *T. sherlocki*. Em nossos estudos realizamos um estudo morfológico do escutelo de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*. Dessas três espécies apenas uma apresentou a forma codiforme, *T. circummaculata*. Além disso, conseguimos diferenciar, assim como Obara, as formas das regiões escutelares e concentração maior ou menor de sensilas provando ser taxonomicamente importante.

O estudo da morfologia externa das fêmeas em triatomíneos, foi reavaliado por ROSA *et al.* (2010) quando verificou diferenças taxonômicas relevantes nas genitálias das fêmeas através da microscopia eletrônica de varredura, as quais permitiram a diferenciação das espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* assim como a identificação taxonômica de 12 espécies de *Rhodnius*, cuja identificação pela morfologia geral externa causava dúvidas (ROSA *et al.* 2011).

Neste trabalho, a utilização da mesma metodologia também possibilitou a separação entre *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, espécies que vivem no mesmo ecótopo e muito parecidas morfológicamente. Foram visualizadas diferenças em vista ventral, onde a parte depois do esternito VII, que constitui as estruturas genitais externos, é duas vezes maiores em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* que em *T. circummaculata*. As observações de MEV em vista lateral e posterior mostram que os gonocoxitos VIII menores em *T. circummaculata*.

Esses resultados confirmam o status de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* no “subcomplexo rubrovaria”, conceituam as diferenças morfológicas dessas espécies e contribuem para um diagnóstico mais precoce nas áreas endêmicas da doença de Chagas no Rio Grande do Sul.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA CE, VINHAES MC, ALMEIDA JR, SILVEIRA AC, COSTA J 2000.  
Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma*

- rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 761-768.
- ARAÚJO SMB, JURBERG J, BARBOSA HS, ROCHA DS, CARCAVALLO RU, GALVÃO C 2005. Morfologia comparada dos ovos e ninfas de *Triatoma vanda* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002 e *Triatoma williamsi* Galvão, Souza & Lima, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(6): 549-561.
- CARCAVALLO RU, GALÍNDEZ-GIRÓN I 1995. Systematic value of the scutellum in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol Vect* 2: 23-29.
- CARCAVALLO RU, GALÍNDEZ-GIRÓN I, CATALÁ S, JURBERG J, LENT H, GALVÃO C, BARATA JMS, VALDERRAMA A 1997. Algumas estruturas anatômicas estudadas com microscopia eletrônica de varredura (MEV). In RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent (eds), *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. I, p. 299-393.
- CARCAVALLO RU, ZELEDÓN R, JURBERG J, GALÍNDEZ-GIRÓN I 1996. Morfologia externa de *Triatoma ryckmani* Zeledón e Ponce, 1972 vista através da microscopia eletrônica de varredura. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 727-731.
- CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR 2007. Estudos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais em cinco espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (HEMIPTERA:REDUVIIDAE:TRIATOMINAE) incluindo a biologia de *Triatoma carcavallo*. [Dissertação], Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 102p.
- GALÍNDEZ-GIRÓN I, CARCAVALLO RU, JURBERG J, LENT H, BARTH OM 1997. Estudo morfológico de *Triatoma guazu* Lent e Wygodzinsky, 1979 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 539-543.
- GONÇALVES TCM, JURBERG J, COSTA JM, SOUZA W 1985. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Côrrea & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 263-276.
- LENT H, WYGODZINSKY P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull American Mus Nat Hist* 163: 123-520.
- OBARA MT, ROSA JA, CERETTI W, URBINATTI PR, QUINTERO LO, BARATA JMS, GALVÃO C, JURBERG J 2007. A study of the scutellum in eight Chagas

- disease vector species from genus *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) using optical and scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(4): 463-468.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD 2012. Site: [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=es](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=es)
- PINTO C 1931. Valor do rostrum e das antenas na caracterização dos triatomíneos. *Boletim Biológico* 19: 45-137.
- ROCHA CS 2009. Variabilidade genética de três colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), (Hemiptera, Reduviidae), oriundas do Estado do Rio Grande do Sul, avaliadas por meio do seqüenciamento de genes do DNA mitocondrial e ribossomal. Dissertação, UNESP, Araraquara, 94p.
- RODRIGUES VLCC, FILHO ANF, SILVA EOR 2005. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843): tábua das ninfas, duração das formas e oviposição das fêmeas. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (3): 251-254.
- ROSA JA, MENDONÇA VJ, ROCHA CS, GARDIM S, CILENSE M 2010. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(3): 286-292.
- ROSA JA, MENDONÇA VJ, ROCHA CS, GARDIM S, OLIVEIRA J, NASCIMENTO JD, PINTO MC, CILENSE M, ALEMIDA CE, GALVÃO C, BARATA JM 2011. Estudo da genitália externa feminina de 12 espécies de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) por microscopia eletrônica de varredura. In: Anais da 27ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos, p.26.
- ROSA JA, ROCHA CS, GARDIM S, PINTO MC, MENDONÇA VJ, FERREIRA-FILHO JCR, CARVALHO EOC, CAMARGO LMA, OLIVEIRA J, NASCIMENTO JD, STEINDEL M, ALMEIDA CE 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62-76.
- SANTOS-MALLET J, CARDOZO-DE-ALMEIDA M, NOVO SC GONÇALVES TCM 2008. Morfologia Externa de *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Através da Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura. *EntomoBrasilis* 1: 37-42.

- SILVA MBA, BARBOSA HS, GALVÃO C, JURBERG J, CARCAVALLO RU 2003. Comparative study of the stridulatory sulcus, buccula and rostrum of the nymphs of *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 and *Triatoma jubergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 by scanning electron microscopy (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 335-344.
- SILVA MBA, JURBERG J, GALVÃO C, BARBOSA HS 2010. Comparative Study of the Stridulatorium Sulcus, Buccula and Rostrum of Nymphs of *Triatoma klugi* Carcavallo *et al*, *Triatoma vandae* Carcavallo *et al* and *Triatoma williami* Galvão *et al* (Hemiptera: Reduviidae). *Neotrop Entomol* 39(1): 35-45.
- TEVES-NEVES SC 2012. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins. [Dissertação], Fundação Oswaldo Cruz, 79p.

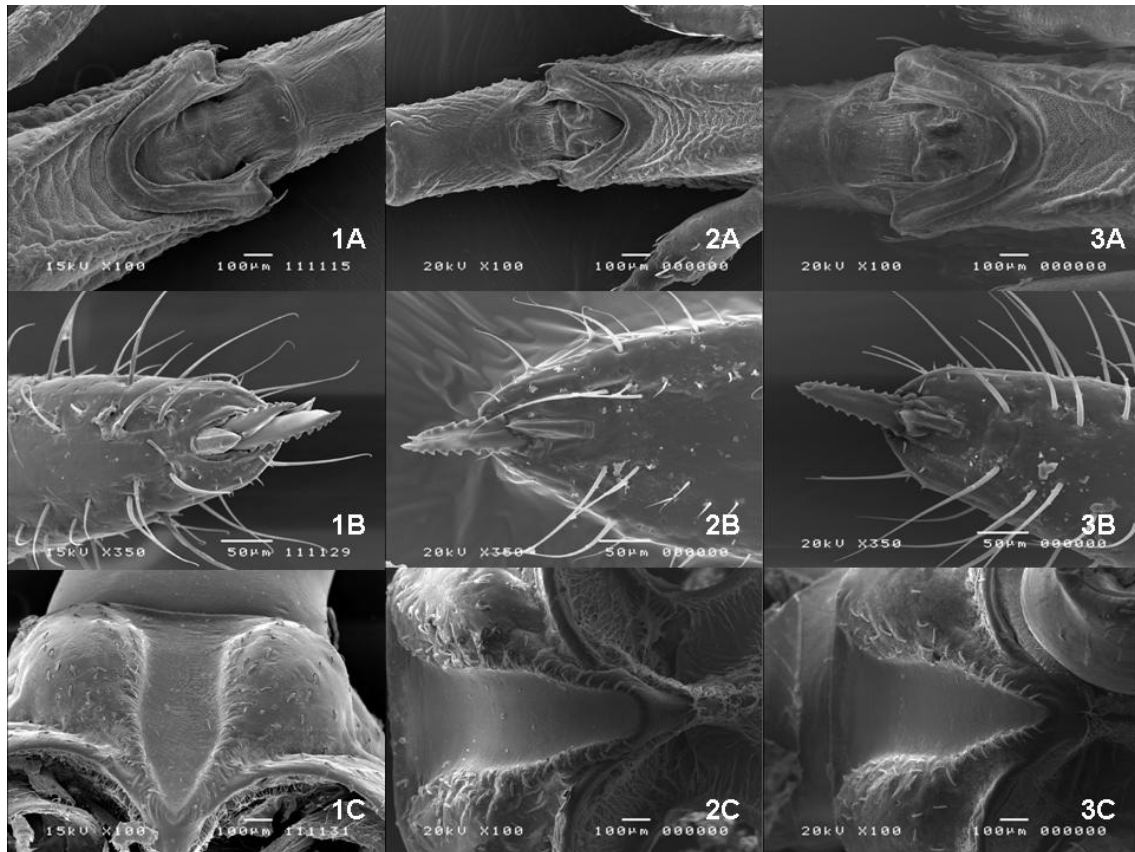


Figura 1: Vista ventral – 1 - *Triatoma carcavalloi*, A - búcula (forma de “U”), B - ápice do rostro, C – sulco estridulatório (forma de “U”); 2 - *Triatoma circummaculata*, A - búcula (forma de “V”), B - ápice do rostro, C – sulco estridulatório (forma de “U”); 3 - *Triatoma rubrovaria*, A - búcula (forma de “U”), B – ápice do rostro, C – sulco estridulatório (forma de “V”).

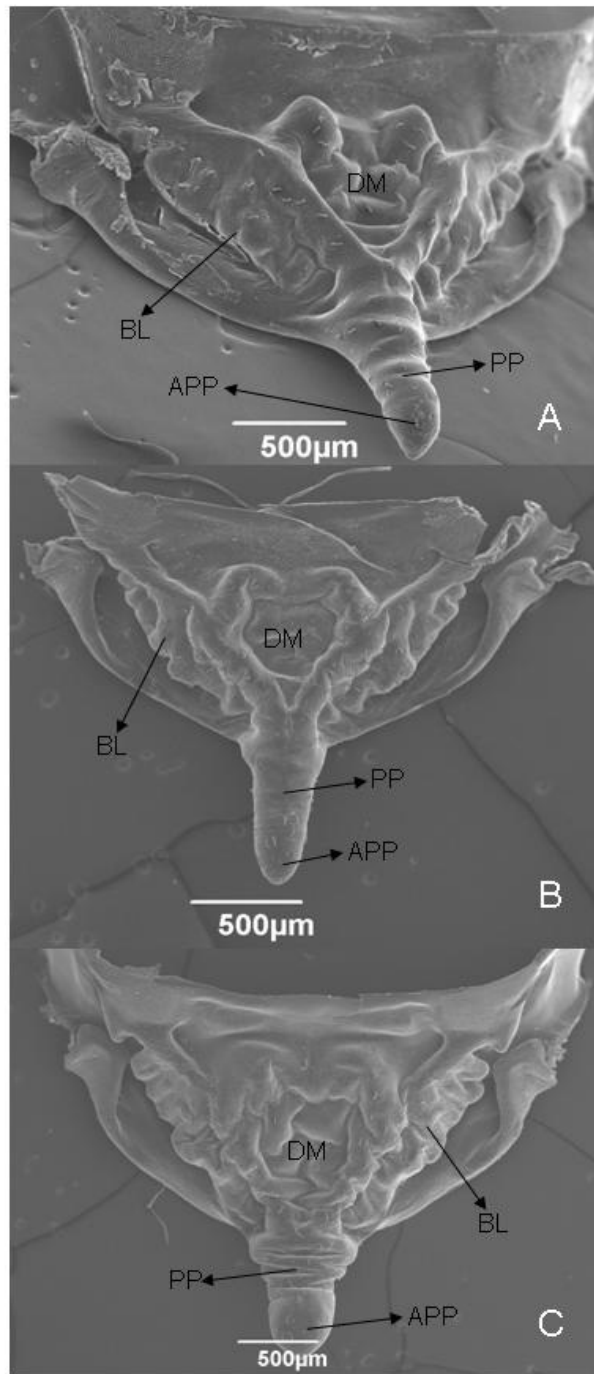


Figura 2: Vista dorsal, 35X – A - *Triatoma carcavalloei*; B - *Triatoma circummaculata*; C - *Triatoma rubrovaria*; PP – processo posterior; APP – ápice do processo posterior; BL – borda lateral; DM – depressão mediana.



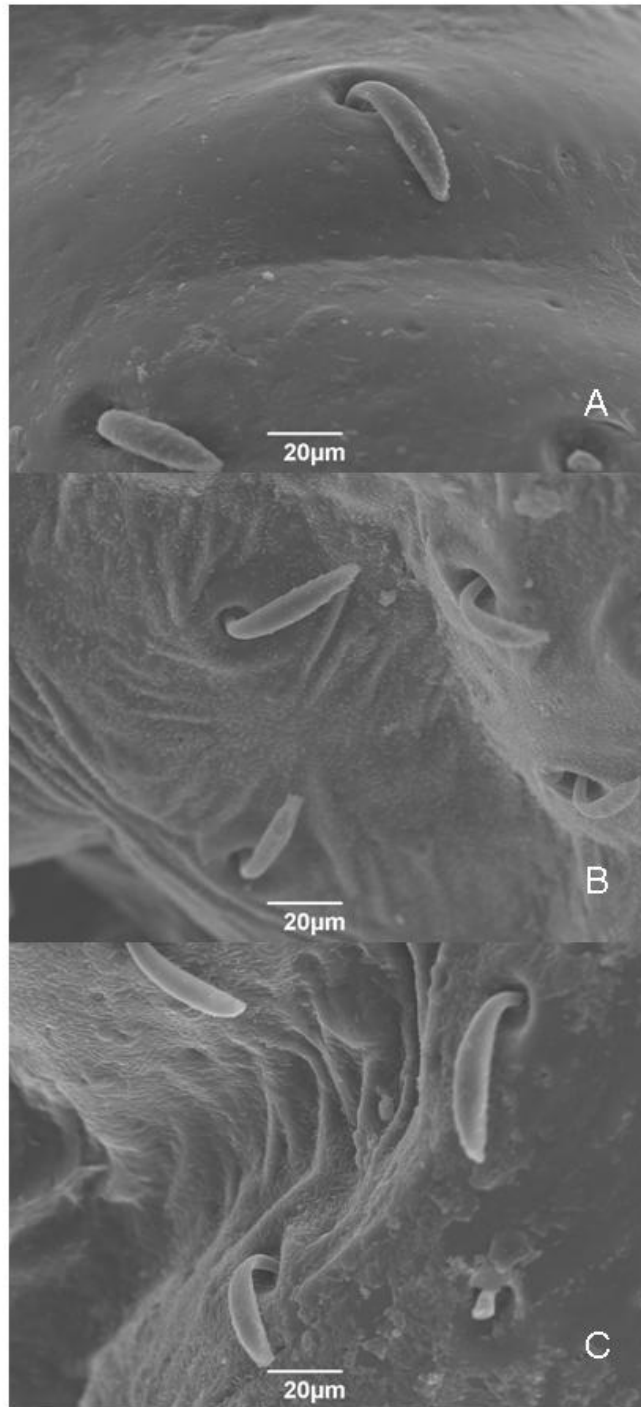


Figura 3: Sensilas no escutelo dos machos em MEV, vista dorsal, 750X – A - *Triatoma carcavalloei*; B - *Triatoma circummaculata*; C - *Triatoma rubrovaria*.

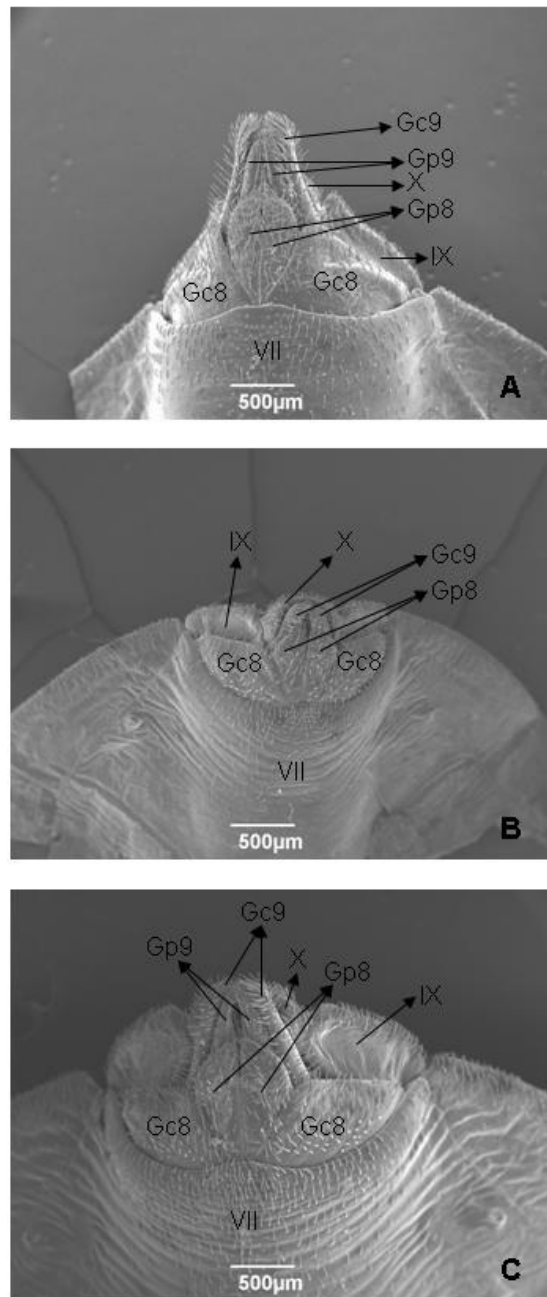


Figura 4: Genitália externa feminina em microscopia eletrônica de varredura, vista ventral, 30X. A: *Triatoma carcavalloei*; B: *Triatoma circummaculata*; C: *Triatoma rubrovaria*; Gc8: gonocoxito 8; Gc9: gonocoxito 9; Gp8: gonopofise 8; Gp9: gonopofise 9; VII e IX: esternitos; X: segmento.

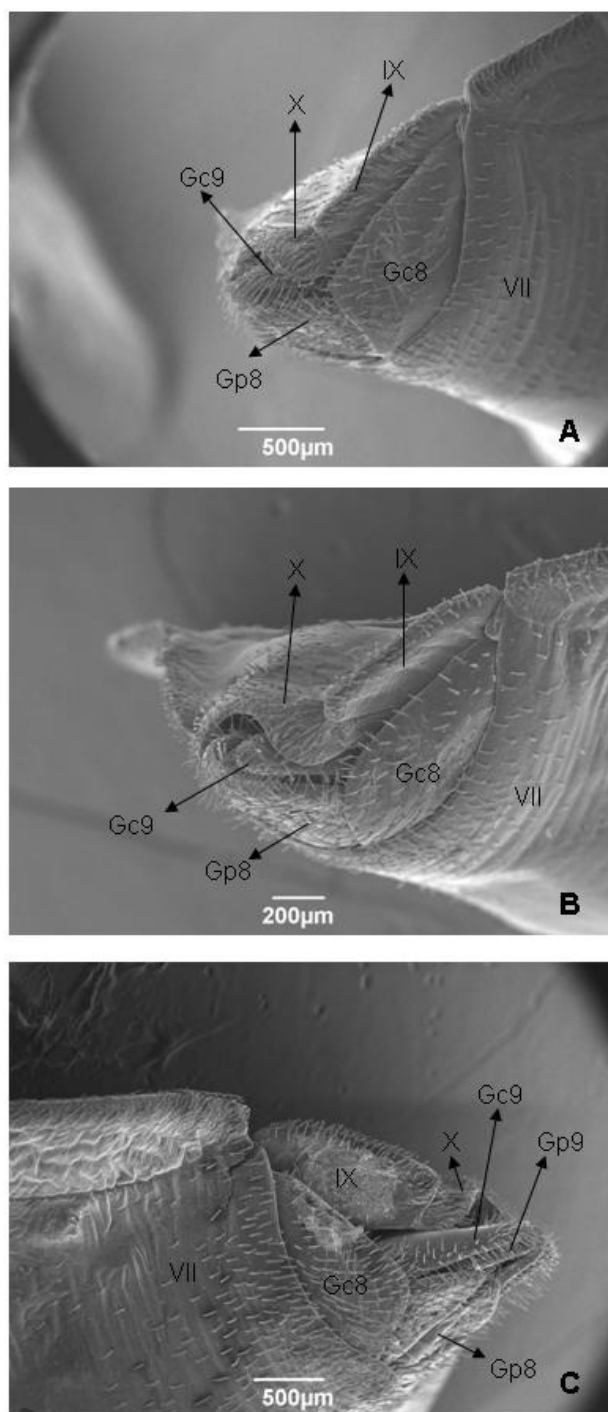


Figura 5: Genitália externa feminina em microscopia eletrônica de varredura, vista lateral. A: *Triatoma carcavalloi*, 30X; B: *Triatoma circummaculata*, 55X; C: *Triatoma rubrovaria*, 30X; Gc8: gonocoxito 8; Gc9: gonocoxito 9; Gp8: gonopofise 8; Gp9: gonopofise 9; VII e IX esternitos e X segmento.

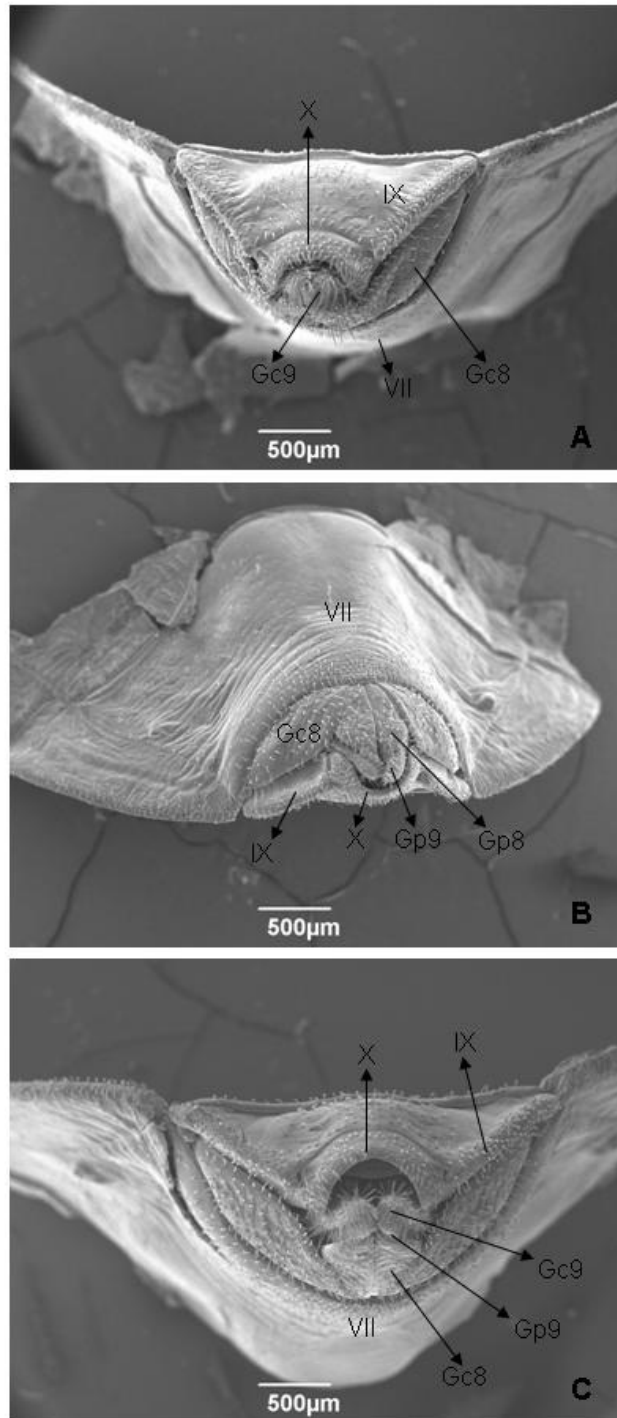


Figura 6: Genitália externa feminina em microscopia eletrônica de varredura, vista posterior, 30X. A: *Triatoma carcavalloei*; B: *Triatoma circummaculata*; C: *Triatoma rubrovaria*; Gc8: gonocoxito 8; Gc9: gonocoxito 9; Gp8: gonopofise 8; Gp9: gonopofise 9; VII e IX esternitos e X segmento.

### 3.0. DISCUSSÃO

No Rio Grande do Sul ocorrem 11 espécies da subfamília Triatominae, divididas quanto aos hábitos em sinantrópicas, habitantes de ninhos de pássaros ou de mamíferos e rupestres ou litófilas, ou seja, associadas a rochas e também a tocas de lagartos e tatus. Entre as rupestres, ocorrem espécies de grande importância pela ampla distribuição e reconhecida capacidade de transmissão de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) como é o caso de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (RUAS-NETO, 2002). Outras espécies deste grupo são importantes porque há pouco conhecimento sobre o seu ciclo vital, pela proximidade morfológica com outras espécies rupestres e pelo desconhecimento do seu potencial transmissor de *T. cruzi*. É o caso das espécies *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859); *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998; *Panstrongylus tupynambai* Lent, 1942; *Triatoma oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939) e *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg & Galvão, 2001.

A taxonomia dos triatomíneos até a década de '60 usava como critérios básicos, caracteres morfológicos externos e cromáticos, observados através da microscopia óptica, aliados às informações da distribuição geográfica (LENT & WYGODZINSKY, 1979). A partir da década de 90', a microscopia eletrônica de varredura (MEV) vem sendo utilizada como uma importante ferramenta para uso na taxonomia, auxiliando na investigação e na análise de estruturas que permitem a diferenciação das espécies. Com a utilização desta técnica, detalhes de algumas estruturas da anatomia externa dos triatomíneos vêm sendo descritos com a finalidade de auxiliar no esclarecimento do status de espécies crípticas (CARCAVALLO *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 1999, 2000, 2002, 2003, JURBERG *et al.*, 2002). Atualmente na sistemática dos triatomíneos têm sido utilizadas também ferramentas moleculares na tentativa de ampliar o conceito específico e, especialmente, de reconstruir a filogenia da subfamília (HYPŠA *et al.*, 2002; GALVÃO, 2003; SCHAEFER, 2003; PAULA *et al.*, 2005). Entretanto, os caracteres morfológicos e morfométricos permanecem como ferramenta indispensável para os estudos sistemáticos e taxonômicos.

Os estudos realizados por PINTO (1931) com microscopia ótica revelaram a importância do rostro na caracterização dos gêneros da subfamília Triatominae, considerando que o comprimento dos artículos desta estrutura nos hemípteros em geral, especialmente nas famílias hematófagas é importante para a sistemática destes insetos. Nossos resultados mostram que o rostro nas três espécies estudadas não apresentam diferenças entre gêneros, ou seja, é similar nas fêmeas e nos machos.

Outra importante estrutura, a búcua, apresenta aspectos variáveis em sua morfologia. Em *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 e *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 ambas pertencentes ao complexo "oliverai", foi observado por SILVA *et al.*, (2003) o aspecto em forma de "U" da búcua, assim como em *Triatoma gerstaeckeri* (Stål, 1859) (FERRO *et al.*, 1997) corroborando com nossos resultados que demonstram a búcua de *T. carcavallo* com este aspecto em forma de "U", diferente do que foi observado em *Rhodnius brethesi* Matta, 1919, onde esta estrutura apresenta-se com uma forma ovalada, com uma constrição mediana, lembrando o formato de um número oito (SANTOS-MALLET *et al.*, 2005).

Segundo GALVÃO *et al.*, (2005), ROCHA *et al.*, (2005), CARCAVALLO *et al.*, (1998) e LENT & WYGODZINSKY (1979), o sulco estridulatório pode ser importante para a identificação entre as espécies, uma vez que pode variar em forma, tamanho, número de fendas e a distância entre estas. A importância desta estrutura foi sublinhada por BARTH (1953) e sua funcionalidade por GALÍNDEZ-GIRÓN *et al.*,

(1998). No presente trabalho, o sulco estridulatório de *T. carcavallo* e de *T. rubrovaria* é em forma de “V” apresentando-se mais largo nas fêmeas do que nos machos, semelhante ao que foi observado por SILVA *et al.* (2003), em *T. guazu*. Já *T. circummaculata* apresenta também esta estrutura com o aspecto de “U”, semelhante ao observado em *T. jurbergi* pelos mesmos autores.

A região da depressão mediana do escutelo de *T. circummaculata* apresentou a forma codiforme (em forma de coração), o que corroborou com os estudos realizados por CARCAVALLO *et al.*, (1997). Já *T. carcavallo* e *T. rubrovaria* apresentaram a forma de W, demonstrada em *T. eratyrisiformis* (OBARA *et al.*, 2007), evidenciando assim, uma diferença entre *T. circummaculata* e as outras duas espécies estudadas.

Comparando os nossos resultados com os obtidos por OBARA *et al.*, (2007), o escutelo de *T. vandae* é bem semelhante ao de *T. carcavallo*, diferindo apenas na disposição das sensilas do processo posterior, uma vez que *T. carcavallo* não apresenta sensilas na região central.

OBARA *et al.*, (2007) realizou uma análise morfológica do escutelo de oito espécies pertencentes ao gênero *Triatoma* e revelou características importantes, especialmente a forma da depressão mediana e o processo posterior escutelar. De todas as espécies estudadas por estes autores, quatro apresentaram a forma da depressão mediana codiforme. Esta forma parece ser uma característica genérica deste grupo, uma vez que de acordo com os dados da literatura em que a maioria das espécies analisadas, até agora exibem este padrão. No entanto, algumas exceções foram encontradas, tais como em *T. tibiamaculata*, *T. eratyrisiformis* e *T. sherlocki*. Em nossos estudos realizamos um estudo morfológico do escutelo de *T. carcavallo*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*. Dessas três espécies apenas uma apresentou a forma codiforme, *T. circummaculata*. Neste caso, observa-se uma diferença entre as três espécies do complexo, o que em uma análise isolada, não favoreceria a permanência destas no mesmo subcomplexo. Apesar disso, conseguimos diferenciar, assim como Obara, as formas das regiões escutelares e concentração maior ou menor de sensilas provando ser taxonomicamente importante.

O estudo da morfologia externa das fêmeas em triatomíneos, foi reavaliado por ROSA *et al.*, (2010) quando verificou diferenças taxonômicas relevantes nas genitálias das fêmeas através da microscopia eletrônica de varredura, as quais permitiram a diferenciação das espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* assim como a identificação taxonômica de 12 espécies de *Rhodnius*, cuja identificação pela morfologia geral externa causava dúvidas (ROSA *et al.*, 2011).

Neste trabalho, a utilização da mesma metodologia também possibilitou a separação entre *T. carcavallo*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, espécies que vivem no mesmo ecótopo e são muito parecidas morfológicamente. Foram visualizadas diferenças em vista ventral, onde observou-se que as estruturas genitais externas, são duas vezes maiores em *T. carcavallo* e *T. rubrovaria* que em *T. circummaculata*. As observações de MEV em vista lateral e posterior mostram que os gonocoxitos VIII menores em *T. circummaculata*.

GALVÃO *et al.*, (2005) publicou uma tabela listando nomes específicos, abordagens utilizadas e referências de trabalhos dedicados à morfologia dos ovos e ninfas de triatomíneos, mostrando quão pouco se sabe sobre a morfologia destes insetos. PINTO (1924) descreveu os ovos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 e GALLIARD (1935) mostrou a importância do aspecto do exócario para a taxonomia, afirmando que as cascas dos ovos da subfamília Triatominae apresentaram uma característica, ornamentação constante em sua superfície externa, que distingue uma espécie da outra. Além desse recurso, Galliard usou outras características macroscópicas, tais como

tamanho, forma, cor, tipo de casca e fixação, entre outros, em seu estudo de ovos desta família. Alguns autores, no entanto, basearam seus estudos nas estruturas morfológicas dos ovos entre espécies (BARATA, 1981, GONÇALVES *et al.*, 1985, ROSA *et al.*, 2000).

O gênero *Triatoma* apresenta alta variabilidade no seu aspecto a nível do exocório macroscópico, caracterizados por células hexagonais com linhas limitantes indeterminadas, com perfurações de tamanho e formas variáveis. Esta característica foi observada em dez espécies, incluindo *Triatoma rubrovaria* (BARATA, 1995).

Nesta tese confirma-se o aspecto geral dos ovos de *T. carcavalloii*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* para o gênero *Triatoma*, e mostra a existência de características morfológicas que são bastante diferentes entre as espécies. Vale destacar que esta é a primeira descrição morfológica através da microscopia eletrônica de varredura e morfometria dos ovos de *T. carcavalloii*.

Além da diferença em termos de tamanho entre os ovos de *T. carcavalloii*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, foram observadas duas outras diferenças morfológicas entre estas três espécies. O número de perfurações por célula do ovo de *T. rubrovaria* é maior que em *T. carcavalloii* e *T. circummaculata*, e estas perfurações no exocório dos ovos e opérculos de *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* estão distribuídos por todas as células, enquanto que no caso de *T. carcavalloii* as perfurações estão concentradas na região central de cada célula.

A textura do exocório do ovo e opérculo de *T. carcavalloii* e *T. rubrovaria* é análoga aos ovos de *T. maculata* e *T. brasiliensis*, como mostrado por GONÇALVES *et al.*, (1985) e JURBERG *et al.*, (1986).

As observações sobre o limite da linha opercular das três espécies avaliadas neste estudo estão de acordo com os dados obtidos por ROSA *et al.*, (2000) para *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*.

De acordo com COSTA *et al.*, (1997), as diferentes condições ambientais, tais como a fonte disponível de alimentos, temperatura e umidade pode afetar direta ou indiretamente a morfologia do ovo, no entanto, este estudo não considerou diferentes condições ambientais, como por exemplo *T. rubrovaria* que é encontrado vivendo em simpatria com *T. carcavalloii* e *T. circummaculata*.

Exceto as diferenças cromáticas e morfológicas entre *T. carcavalloii* e *T. rubrovaria* descritas por JURBERG *et al.*, (1998) e as de *T. rubrovaria* descritas por ROSA *et al.*, (1999), este estudo pode usar as diferenças morfológicas entre os ovos para mostrar que *T. carcavalloii*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* são espécies distintas.

Desde a descrição de *Triatoma carcavalloii*, nenhum outro estudo foi realizado para elucidar a filogenia, ecologia, bionomia, ou aspectos epidemiológicos desta espécie. Características morfológicas levaram JURBERG *et al.*, (1998) a considerar *T. carcavalloii* uma espécie intimamente relacionada com *T. rubrovaria*. DUJARDIN *et al.*, (2002) apresentou uma revisão dos complexos de triatomíneos e subcomplexos baseados em caracteres morfológicos, onde *T. circummaculata* foi colocada para fora do “complexo infestans”. DUJARDIN *et al.*, (2002) já havia afirmado que este agrupamento não tem corroborado com estudos moleculares anteriores onde *T. circummaculata* foi encontrado mais intimamente relacionado com os membros do “complexo infestans” (GARCÍA & POWELL, 1998; GARCÍA *et al.*, 2001). Nosso conjunto de dados moleculares reforçaram as descobertas anteriores baseadas em sequências de DNA, com a evidência acrescentada da nossa análise morfométrica sugerindo que *T. circummaculata* deve ser incluída no “complexo infestans” e não colocada num complexo separado. Ambas as abordagens usadas aqui sugerem ainda que

*T. circummaculata* deve ser colocado mais especificamente no “subcomplexo rubrovaria”.

As análises morfométricas demonstraram que *T. rubrovaria* do Brasil e do Uruguai apresentaram um grau de diferenciação populacional que concorda com a variação intraespecífica mostrada por PACHECO *et al.*, (2003, 2007) para as populações desses países por meio de marcadores moleculares (análises de RAPD e sequências de intergenic-spacer entre rDNA). Nós compreendemos que a variabilidade fenotípica pode ser influenciada por vários fatores, tais como ecótopo, hospedeiros, temperatura e outros. No entanto, os resultados morfométricos para níveis intraespecíficos e interespecíficos exibiram uma considerável conformidade com os dados genéticos dos membros do “subcomplexo rubrovaria” em relação aos grupos externos escolhidos. Acreditamos que a morfometria poderia refletir melhor as relações genéticas se fossem incluídos mais espécimes, melhorando a solidez dos resultados usando a abordagem de morfometria geométrica, e aumentando o número de variáveis para a análise.

As experiências com cruzamentos têm sido úteis para permitir inferências sobre as relações genéticas e reprodutivas compatíveis entre os táxons (COSTA *et al.*, 2003), assim nós sugerimos experiências laboratoriais de cruzamento entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* para entender melhor as relações entre estes três triatomíneos que habitam o mesmo ecótopo. Essas três espécies estão restritas a pradarias mistas, regiões de savana e/ou estepe subtropicais no sul do Brasil, nordeste da Argentina e Uruguai. Durante este estudo, todas as três espécies foram encontradas compartilhando um abrigo em uma localidade específica, portanto, aparentemente ocupando o mesmo nicho ecológico num ambiente modificado pelo homem. Forças que possibilitaram que estas espécies pudessem se diferenciar (especializar) permaneceu obscuras. No entanto, acreditamos que as espécies têm pouco tempo que convergiram para o habitat após especiação devido a mudanças ambientais causadas pelas atividades humanas. Segundo ALMEIDA *et al.*, (2002a, 2008) atividades humanas podem criar o ambiente ruderal, o que pode produzir situações propícias para a instalação de alguns triatomíneos, uma vez que a fauna predadora pode ser modificada e o recurso alimentar de sangue para triatomíneos pode ser melhorado aumentando o número de animais domésticos, tais como frango, ovinos, cabras, porcos e vacas. Quatro outras espécies de triatomíneos (*T. brasiliensis*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata* e *Rhodnius neglectus*) já foram encontrados compartilhando o ecótopo peridomiciliar como resultado das atividades humanas (MARCHON-SILVA *et al.*, 1998). Portanto, sugerimos um olhar mais atento para estas três espécies, onde eles ocorrem em ambientes não modificados. Salvatella (comunicação pessoal) encontrou híbridos naturais de *T. infestans* e *T. rubrovaria*.

A análise filogenética sugere que *T. carcavalloi* é espécie irmã de *T. rubrovaria*, o que foi corroborado pela abordagem morfométrica. Ressaltamos que *T. rubrovaria* apresenta características bionômicas de um bom vetor de *T. cruzi* (ALMEIDA *et al.*, 2000, 2002a, b, 2003, 2005) e pode manter altas taxas (25%) de infecção natural deste parasita (MARTINS *et al.* 2003, 2008). De acordo com JURBERG *et al.*, (1998), *T. carcavalloi* também pode invadir domicílios humanos. ALMEIDA *et al.*, (2009) mencionaram uma maior atenção ao monitoramento domiciliar pela invasão de *T. carcavalloi*.

Vários autores têm destacado a importância de se estudar os parâmetros bionômicos em triatomíneos em condições laboratoriais, seja para aumentar o conceito biológico da espécie, ou para melhorar as condições de reprodução para a formação de colônias de laboratório, ou oferecer subsídios para estudos de controle (ROCHA *et al.*,



1994, GALVÃO *et al.*, 1996, COSTA & MARCHON-SILVA, 1998, RODRIGUES *et al.*, 2005).

SILVA (1985) e GOMES & SILVA (2000) enfatizaram a importância de cuidar dos triatomíneos recém-alimentados, porque o manuseio inadequado é a principal causa de mortalidade em uma criação.

De acordo com SILVA (1985), em condições de laboratório onde fatores abióticos são mais estáveis, os ciclos de vida são geralmente mais curtos. No entanto, algumas espécies podem apresentar um ciclo de vida mais longo, tal como a diapausa de ninfas de quinto estágio, observada em algumas espécies selvagens (LENT & WYGODZINSKY 1979), como foi visto neste estudo: ninfas de quinto estágio requerem vários repastos sanguíneos para realizar a muda, o que alonga esta fase até mais de um ano. RUAS-NETO (2002) observou essa mesma característica para *T. carcavallo*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* alimentados com pombos.

O primeiro estudo sobre o ciclo biológico de *T. carcavallo* em condições laboratoriais foi realizada por RUAS-NETO *et al.*, (2001), onde alimentou os insetos com pombos, baratas e lagartos. Outros autores estudaram o ciclo biológico de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* alimentados com hemolinfa de Blattodea (baratas), para avaliar o desenvolvimento de ninfas (LOROSA *et al.*, 2000a). Este estudo sugere que este tipo de alimento pode ser um processo natural para essas espécies de triatomíneos, e provavelmente representa uma forma de sobreviver em condições naturais. A dependência da hemolinfa é muito evidente em *T. circummaculata*, pois as ninfas de primeiro estágio não se desenvolvem no laboratório se este tipo de alimento não estiver disponível (RUAS-NETO & CORSEUIL, 2002; MARTINS *et al.*, 2006). LOROSA *et al.*, (2000b) concluíram que algumas espécies de triatomíneos têm hábitos alimentares bastante ecléticos em suas condições naturais.

DI PRIMIO (1953) e RODRIGUES *et al.*, (2005) observaram que *T. rubrovaria* desenvolve bem em condições de laboratório, com temperaturas entre 20°C e 30°C e umidade relativa do ar mantida em torno de 80%, obtendo um tempo de vida diferente para cada sexo: para os machos, a duração média foi de 115,37 dias, enquanto as fêmeas viveram uma média de 99,6 dias. SILVA (1985) estudou a influência da temperatura (25°C e 30°C) em *T. rubrovaria* e observou um desenvolvimento mais rápido a 30°C. No presente estudo, as temperaturas iguais ou superiores a 28°C, influenciaram no desenvolvimento de *T. carcavallo*, encurtando o seu ciclo de vida, quando comparado com *T. rubrovaria*.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1969) estudaram o ciclo de vida de *Triatoma infestans* e FELICIANGELI *et al.*, (1980) realizaram estudos sobre a resistência ao jejum de *Rhodnius prolixus* e em ambos os trabalhos, os autores estimaram que o repasto sanguíneo representa uma condição essencial para oviposição em geral e fertilidade em particular. Em nosso estudo a primeira oviposição ocorreu no sexto dia após o repasto sanguíneo. Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012), a oviposição ocorre entre 10 a 30 dias após a cópula e o número de ovos varia de acordo com a espécie e, principalmente, em função do estado nutricional da fêmea. Uma fêmea fecundada e alimentada pode realizar posturas por todo o seu período de vida adulta. ARGÜELLO *et al.*, (1988) em seus estudos com *Triatoma rubrovaria* não sabem se a baixa eclosão de ovos foi devido a esse fator, porque os espécimes utilizados nos experimentos foram alimentados uma vez por semana durante uma hora, sem estabelecer o nível de sangue ingerido por cada indivíduo. Já em nossos estudos a alimentação foi padronizada, *T. carcavallo* foi alimentado em camundongos uma vez por semana até a repleção, por isso não podemos dizer que a baixa eclosão foi devido a

alimentação ou a outros fatores, tais como temperatura e umidade sob condições laboratoriais.

Em nossos estudos, nem todos os ovos eclodiram, o que comprometeu a fertilidade, seja devido a pequenas variações de temperatura ou umidade durante o experimento, fatores conhecidos por influenciar diretamente o desenvolvimento, ou por alguma outra causa desconhecida.

A taxa de eclosão dos ovos varia entre as espécies do gênero *Triatoma*, e até mesmo dentro de uma mesma espécie. Em *T. carcavalloei*, a taxa foi de 38,3%, considerado baixo quando comparado com *T. flavida*, que apresentou uma taxa de 93% dos ovos eclodidos de acordo com CABELLO & LIZANO (2001), com *T. pseudomaculata*, onde a taxa foi de 88,3% de acordo com GONÇALVES *et al.*, (1997) e um intervalo de 60 a 80% de acordo com DAMBORSKY *et al.*, (2005) para *T. rubrovaria*, ZELEDON *et al.*, (1970) para *T. dimidiata*, RABINOVICH (1972) para *T. infestans*, FELICIANGELI & RABINOVICH (1985) para *T. maculata*, BRAGA *et al.* (1998) para *T. rubrofasciata* e MARTINEZ-IBARRA & KATTHAIN-DUCHATEAU (1999) para *T. pallidipennis*. No caso do gênero *Rhodnius*, a temperatura observada influencia não apenas no período de incubação, mas também na incidência de eclosão dos ovos, como mostrado por ROCHA *et al.*, (2001) para *Rhodnius robustus*.

ARGÜELLO *et al.*, (1988) mostraram que o período médio de incubação dos ovos para *T. rubrovaria* foi de 24,84 dias, já em nosso estudo o período de incubação dos ovos de *T. carcavalloei* foi menor, 22,7 dias.

Neste estudo, a primeira refeição das ninfas de primeiro estágio de *T. carcavalloei* resultou em maior frequência nos dias 2 e 4, semelhante aos resultados encontrados por GONÇALVES *et al.*, (1997), que determinaram este parâmetro biológico para *T. pseudomaculata* e diferente de *T. vitticeps* que possui uma preferência nos dias 3, 6 e 10 (GONÇALVES *et al.*, 1988).

O ciclo de vida de *T. carcavalloei* necessita em média de 13,4 refeições sanguíneas, superior ao observado em *T. rubrovaria* - 11,1 (ALMEIDA *et al.*, 2005), em *T. vitticeps* - 8 (GONÇALVES *et al.*, 1988) e em *T. brasiliensis* - 11 (SOARES *et al.*, 2000) e menor que *T. pseudomaculata* - 14,7 (GONÇALVES *et al.*, 1997). Devemos considerar que essas espécies vivem em diferentes habitats e hábitos alimentares. GONÇALVES *et al.*, (1997) mencionam que as fêmeas de *T. pseudomaculata* para compensar a menor quantidade de sangue ingerida, procuraram a fonte de alimento em um curto espaço de tempo, além de realizar um maior número de refeições sanguíneas. Já as ninfas de quinto estágio de *T. carcavalloei* fazem vários repastos para realizar a ecdise.

ALMEIDA *et al.*, (2005) observaram que a média do período de intermuda das ninfas de segundo estágio (N2) de *T. rubrovaria* foi maior do que as ninfas de terceiro estágio (N3). Os resultados obtidos por SILVA (1985) em *T. rubrovaria* e COSTA & MARCHON-SILVA (1998) em *T. brasiliensis*, em condições de temperatura padrão, tendem a mostrar uma escala crescente dos períodos de intermuda de N1 a N5, corroborando com nossos estudos.

GONÇALVES *et al.*, (1989) mostraram que uma das barreiras para o sucesso do combate aos vetores da doença de Chagas através de inseticidas de ação residual, é a capacidade de resistência ao jejum. A resistência ao jejum permite que esses animais permaneçam em seus abrigos, livre de inseticidas e efeitos residuais, aumentando assim a possibilidade de nova colonização pelos indivíduos restantes (DIAS, 1965; COSTA & PERONDINI, 1973; GALVÃO *et al.*, 1996; CORTEZ & GONÇALVES, 1998; CABELLO, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2003; CAILLEAUX *et al.*, 2011). LENT & WYGODZINSKY (1979) comentaram que ninfas toleram períodos de jejum mais

longos do que os adultos, confirmando nossos estudos e FELICIANGELLI *et al.*, (1980) justifica como uma compensação dos adultos, a maior capacidade de dispersão.

O período de resistência ao jejum de *T. carcavallo* aumentou a partir do 1º ao 5º estágio ninfal. Na fase adulta, os machos exibiram menor resistência quando comparado as fêmeas, corroborando com os dados de SILVA (1985), obtidos a uma temperatura de 30°C para *T. rubrovaria* e JUAREZ & SILVA (1982), obtidos nas temperaturas de 25°C e 30°C para *T. sordida*. Estes resultados não estão em consonância com os obtidos para *T. vitticeps* (GONÇALVES *et al.*, 1989) e *T. rubrovaria* (ALMEIDA *et al.*, 2003), que demonstraram mais resistência ao jejum em machos.

A influência da alimentação sobre a mortalidade das ninfas foi mostrado por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1953, 1969), onde as ninfas de *T. infestans* quando alimentadas a intervalos mais longos, a taxa de mortalidade aumentou. OSCHEROV *et al.*, (2005) mostraram que a taxa de mortalidade foi maior em ninfas de terceiro estágio de *Triatoma rubrovaria*, corroborando com nossos estudos, onde a taxa foi de 22,2%.

No presente estudo a longevidade dos machos de *Triatoma carcavallo* foi mais longa, tal como observado para *Triatoma rubrofasciata* (BRAGA *et al.*, 1998) e *Triatoma rubrovaria* (SILVA, 1985; ARGÜELLO *et al.*, 1988; DAMBORSKY *et al.*, 2005 e OSCHEROV *et al.*, 2005). Já RUAS-NETO (2002) observou que a longevidade das fêmeas de *T. carcavallo* foi maior, sugerindo uma provável influência da alimentação, onde os insetos foram alimentados em pombos com intervalos de 10 a 15 dias, em períodos de 2 a 3 horas.

RUAS-NETO (2002) verificou que o ciclo de desenvolvimento das ninfas de quinto estágio de *T. carcavallo* alimentados em pombos foi de 259,67 dias, em média, diferente deste trabalho, onde os insetos foram alimentados em camundongos e sua média foi de 193,43. DAMBORSKY *et al.* (2005) observaram que o ciclo de vida total de *T. rubrovaria* foi de 300 dias, já nos nossos estudos mostraram que o ciclo de vida de *T. carcavallo* foi de 503,4 dias.

RUAS-NETO & CORSEUIL (2002) referiram que a capacidade de transmissão mostrada por *T. carcavallo* é tão elevada como a de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* (infectada com menor frequência). Provavelmente esse fato ocorra devido a se alimentar com menos frequência em mamíferos.

#### 4.0. CONCLUSÕES

1. Ampliamos o conhecimento sobre a morfologia de *T. carcavalloi* contribuindo para a identificação desta espécie nas áreas endêmicas da doença de Chagas no Rio Grande do Sul;
2. A análise filogenética sugere que *T. carcavalloi* é espécie irmã de *T. rubrovaria*, o que foi corroborado por uma abordagem morfométrica.
3. Os dados moleculares baseados em sequências de DNA adicionados as análises morfométricas sugerem que *T. circummaculata* deve ser incluída no “complexo infestans” e não colocada em complexo separado. Ambas as abordagens usadas aqui sugerem ainda que *T. circummaculata* deve ser colocada mais especificamente no “subcomplexo rubrovaria”.
4. O aspecto geral dos ovos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* para o gênero *Triatoma* demonstra a existência de caracteres morfológicos bastante diferenciados entre eles, principalmente no que diz respeito à quantidade de perfurações presentes nas células dos corpos dos ovos e dos opérculos, comprovando que são espécies distintas;
5. As principais diferenças morfológicas existentes entre os machos e as fêmeas estão na búcula, rostro e no sulco estridulatório das espécies estudadas, confirmando o valor taxonômico destas estruturas para a taxonomia dos triatomíneos;
6. A forma codiforme na região mediana da depressão escutelar, não parece ser uma característica do gênero *Triatoma*, pois somente *T. circummaculata* possui esta forma enquanto *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* não apresentam tal forma.
7. Em todos os caracteres morfológicos estudados apontaram diferenças significantes nas três espécies, colocando cada espécie em seu status específico. Entretanto, a espécie que difere em maior número de características, principalmente no tamanho das estruturas é *Triatoma circummaculata*.
8. Nossos resultados apontam que características biológicas são critérios importantes para determinar a relação entre as espécies *Triatoma carcavalloi*, *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* coletados nos domicílios do Rio Grande do Sul, Brasil, além de sugerir maior vigilância epidemiológica em relação as três espécies estudadas;
9. À resistência ao jejum de *T. carcavalloi* aumenta de acordo com a fase de desenvolvimento e os resultados obtidos mostram que as fêmeas são mais resistentes que os machos.
10. Ninfas de quinto estágio (N5) precisam de vários repastos sangüíneos para efetuar a ecdise e se tornar um inseto adulto, que ocorre com mais de um ano.
11. As temperaturas iguais ou superiores a 28°C influenciaram o desenvolvimento de *T. carcavalloi*, encurtaram o seu ciclo de vida.

## 5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese foram realizados estudos biológicos, filogenéticos, morfológicos, morfométricos e moleculares com a finalidade de comparar três espécies do “subcomplexo rubrovaria”. As análises moleculares e filogenéticas juntamente com os parâmetros biológicos de *T. carcavalloei* e morfológicos relativos ao estudo da búcula, rostro, sulco estridulatório, escutelo, genitália feminina, ovos e opérculos de *T. carcavalloei*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, bem como o estudo morfométrico destas três espécies, mostraram resultados significativos. Entretanto, aponta-se a importância da observação de alguns parâmetros morfométricos como: a geometria das asas e as medidas de machos e fêmeas das três espécies.

## 6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA CE, MARCET PL, GUMIEL M, TAKIYA DM, CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR, PACHECO RS, LOPES CM, DOTSON EM, COSTA J. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *J Vect Ecology* v. 34(2), p. 164-173, 2009.
- ALMEIDA CE, PACHECO RS, HAAG K, DUPAS S, DOTSON EM, COSTA J. Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 78, p. 791-802, 2008.
- ALMEIDA CE, FOLLY-RAMOS E, AGAPITO-SOUZA R, MAGNO-ESPERANÇA G, PACHECO RS, COSTA J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 231-235, 2005.
- ALMEIDA CE, FRANCISCHETTI CN, PACHECO RS, COSTA J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 367-371, 2003.
- ALMEIDA CE, PACHECO RS, NOIREAU F, COSTA J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 829-834, 2002b.
- ALMEIDA CE, DUARTE R, PACHECO RS, COSTA J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1127-1131, 2002a.
- ALMEIDA CE, VINHAES MC, ALMEIDA JR, SILVEIRA AC, COSTA J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 95, p. 761-768, 2000.
- ANEZ N, VALENTA DT, CARSOLA D, QUICKE DJ, FELICIANGELI MD. Multivariate analysis discriminate species of Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae), *Lutzomyia townsendi*, *L. spinicrassa* and *L. young*. *J Med Entomol*, v. 34, p. 312-316, 1997.
- ARAGÃO MB, DIAS E. Aspectos climáticos da doença de Chagas. *Rev Bras Malar D Trop*, v. 8, p. 633-41, 1956.
- ARGOLO AM, FÉLIX M, PACHECO R, COSTA J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. *Fundação Oswaldo Cruz (PIDC)*, 67p, 2008.

- ARGÜELLO, NV, MISCHIS CC, CIVITTA G, BONINO EE. Ciclo biológico de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Reduviidae, Triatominae) en laboratorio. Rev Bras Zool, v. 5(2), p. 245-251, 1988.
- BAR ME, MILANO AMF, DAMBORSKY MP, OSCHEROV EB, AVALOS G. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. Rev Soc Entomol Argentina, v. 63, p. 107-113, 2003.
- BARATA JMS. Macroscopic and exocorial structures of Triatomines eggs (Hemiptera, Reduviidae). Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). In RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent (orgs.), Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas, Fiocruz, Rio de Janeiro, v. II, p. 409-448, 1998.
- BARATA JMS. In Proc Inter workshop on population genetics and control of Triatominae, Ecuador, p. 55-58, 1995.
- BARATA JMS. Morphological aspects of Triatominae eggs. II - Macroscopic and exochorial characteristics of 10 species of the genus *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera - Reduviidae). Rev Saúde Pública, v. 15(5), p. 490-542, 1981.
- BARTH R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). III parte: Pesquisas sobre o mecanismo da picada dos Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 51, p. 11-68, 1953.
- BRAGA MV, PINTO ZT, LIMA MM. Life cycle and reproductive patterns of *Tiatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 93 (4), p. 539-542, 1998.
- BUSTAMANTE FM. Distribuição geográfica dos transmissores da doença de Chagas no Brasil e sua relação com certos fatores climáticos. Epidemiologia e profilaxia da enfermidade. Rev Bras Malar, v. 9, p. 191-211, 1957.
- CABELLO DR, LIZANO E. Biology of *Triatoma flavida* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae) under Laboratory Conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96 (6), p. 879-881, 2001.
- CABELLO DR. Resistance to Starvation of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under Experimental Conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96(4), p. 587-591, 2001.
- CAILLEAUX SRP, CUNHA V, VERLY S, JUNIOR VDL, JURBERG J. Resistência ao jejum de *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de laboratório. Rev Pan-Amaz Saúde, v. 2 (2), p. 39-43, 2011.
- CARANHA L, GURGEL-GONÇALVES R, RAMALHO RD, GALVÃO C. New records and geographic distribution map of *Triatoma petrocchiae* Pinto and Barreto, 1925 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Check List, v. 7 (4), p. 508-509, 2011.

- CARBAJAL DE LA FUENTE AL, CUNHA V, ROCHA NL, LOPES CM, NOIREAU F. Comparative biology of the two sister species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 43, p. 15-18, 2010.
- CARCAVALLO RU, JURBERG J, LENT H, GALVÃO C, STEINDEL M, PINTO CJC. “A new species of the *oliveirai* complex (new designation for *matogrossensis* complex) from the state of Rio Grande do Sul, Brazil”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96 (1), p. 71–79, 2001.
- CARCAVALLO RU, GALVÃO C, LENT H. *Triatoma jurbergi* sp. n. do norte do estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) com uma atualização de sinónimas e outros táxons. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 93 (4), p. 459-464, 1998.
- CARCAVALLO RU, GIRÓN IG, JURBERG J, LENT H. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, v. I, 393p, 1997.
- CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR. Estudos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais em cinco espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (HEMIPTERA:REDUVIIDAE:TRIATOMINAE) incluindo a biologia de *Triatoma carcavalloi*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, [Dissertação], 102p, 2007.
- CDC - Centers for Disease Control And Prevention. Chagas Disease. Disponível em : <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>. Acesso em: 20/09/2012.
- CORREA RR. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no estado de São Paulo. *Rev Bras Malariol Doen Trop*, v. 20, p. 39-81, 1968.
- CORTÉZ MGR, GONÇALVES TCM. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 93 (4), p. 549-554, 1998.
- COSTA J, ALMEIDA CE, DUJARDIN JP, BEARD CB. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 637-639, 2003.
- COSTA J, BARTH OM, MARCHON-SILVA V, ALMEIDA CE, FREITAS-SIBAJEV MGR, PANZERA F. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structures and eggs of different chromatic forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 493-498, 1997.
- COSTA J, LORENZO M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and controlo f triatomines – Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 4(Suppl I), p. 46-51, 2009.
- COSTA J, MARCHON-SILVA V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol y Vect*, v. 5 (1), p. 23-34, 1998.



- COSTA MJ, PERONDINI ALP. Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. Rev Saúde Pub São Paulo, v. 7, p. 207-217, 1973.
- COURA JR, BARRETT TV, NARANJO MA. Human populations attacked by wild Triatominae in the Amazonas: a new form of transmission of Chagas disease? Rev Soc Bras Med Trop, v. 27(4), p. 251-254, 1994.
- COUTINHO PP, PINTO OS, BARBOSA JA. Contribuição ao conhecimento da distribuição dos triatomídeos domiciliários e de seus índices de infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* no Estado do Rio Grande do Sul. Rev Brasil Malariol D Trop, v. 4, p. 211-226, 1952.
- CURTO DE CASAS SI, CARCAVALLO RU, GALÍNDEZ-GIRÓN I, BURGOS JJ. Bioclimatic factors and zones of life. Fatores bioclimáticos e zonas de vida. In: Atlas of Chagas disease vector in the Américas / Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. (Carvalho RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H, org.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, v. 3. p. 793-838, 1999.
- DAMBORSKY MP, BAR ME, GORLA D. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) under constant and fluctuating conditions of temperature and humidity. Rev Soc Bras Med Trop, v. 38(5), p. 433-437, 2005.
- DI PRIMIO P. Sobre o *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) no Rio Grande do Sul. Rev Medicina Rio Grande do Sul, p. 402-408, 1953.
- DI PRIMO P. Atual distribuição geográfica dos triatomídeos e seus índices de infecção no Rio Grande do Sul. An Fac Med Porto Alegre, v. 17, p. 17-37, 1957.
- DIAS JCP. Observações sobre o comportamento de triatomíneos brasileiros frente ao jejum, em laboratório. Rev Bras Malariol D Trop, v. 17, p. 55-63, 1965.
- DIAS JCP, SILVEIRA AC, SCHOFIELD CJ. The impact of Chagas disease in Latin America – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97 (5), p. 603–612, 2002.
- DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ, PANZERA F. Les Vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Academie Royale des Sciences d’Outre Mer. Bruxelles, Belgique. 162 p, 2002.
- DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ, PANZERA F. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d’Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales, NS 24, 162 p, 2000.
- DUJARDIN JP, CHÁVEZ T, MORENO JM, MACHANE M, NOIREAU F, SCHOFIELD CJ. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol, v. 36(6), p. 653-659, 1999a.
- DUJARDIN JP, PANZERA P, SCHOFIELD CJ. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94(Suppl. I), p. 223-228, 1999b.

- DUJARDIN JP, FORGUES G, TORREZ M, MARTINEZ E, CORDOBA C, GIANELLA A. Morphometric of domestic *Panstrongylus rufoturbeculatus* in Bolivia. *Annals of Trop Med & Parasitol*, v. 92(2), p. 219-228, 1998.
- DUJARDIN JP, BERMUDEZ H, CASINI C, SCHOFIELD CJ, TIBAYRENC M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *Journal Med Entomol*, v. 34(5), p. 544-51, 1997a.
- DUJARDIN JP, BERMUDEZ H, SCHOFIELD CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica*, v. 66(3), p. 145-53, 1997b.
- FELICIANGELI D, RABINOVICH J, FERNANDEZ E. Resistencia al ayuno em triatomíneos (Hemíptera, Reduviidae) Venezolanos. I. *Rhodnius prolixus* Stal. *Rev Inst Trop São Paulo*, v. 22, p. 53-61, 1980.
- FELICIANGELI MD, RABINOVICH J. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. II. *Triatoma maculata*. *J Med Entomol*, v. 22, p. 43-48, 1985.
- FERRO ZPA, BARBOSA HS, JURBERG J, CARCAVALLO RU. The buccula and gula of Triatominae nymphs by scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Microscopica*, v. 6, p. 572-573, 1997.
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/media/Sequenciamento%20de%20DNAfinalnew1.pdf>. Acesso em: 25/09/2012.
- GALÍNDEZ-GIRÓN I, ROCHA DS, LENT H, CARCAVALLO RU, JURBERG J, GALVÃO C, BARBOSA HS, MARTÍNEZ A, BARATA JMS, ROSA J. Nymphal stages. Estádios ninfais. v. II. p.449-513. In Carcavallo R U, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H, Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 1217p, 1998.
- GALLIARD H. Recherches sur les réduvidés hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. IV - Organes génitaux femelles. *Ann Parasitol Hum Comp*, v. 13, p. 497-527, 1935.
- GALLIARD H. Recherches sur les réduvidés hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. VIII. Le development de l'oeuf des triatomés a temperature constante. *Ann Parasitol Hum Comp*, v. 14, p. 97-112, 1936.
- GALVÃO C, MCALOON M, ROCHA DS, SCHAEFER CW, PATTERSON J, JURBERG J (2005). Description of eggs and nymphs of *Linshcosteus karupus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Ann Entomol Soc Am*, v. 98, p. 861-872, 2005.
- GALVÃO C. A Sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol y Vect*, v. 10, n. 4, p. 511-530, 2003.

- GALVÃO C, JURBERG J, LENT H . Resistência ao jejum de *Triatoma nitida* Usinger, 1939 em laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 91, n. 5, p. 639-640, 1996.
- GARCÍA BA, MORIYAMA EN, POWELL JR. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. J Med Entomol, v. 38, p. 675-683, 2001.
- GARCÍA BA, POWELL JR. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. J Med Entomol, v. 35, p. 232–238, 1998.
- GOMES AB, SILVA IG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XXI. *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Patol Trop, v. 29, p. 85-93, 2000.
- GONÇALVES TCM, CUNHA V, OLIVEIRA E, JURBERG J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Côrrea & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 92 (2), p. 275-280, 1997.
- GONÇALVES TCM, JURBERG J, COSTA JM, SOUZA W. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Côrrea & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 80 (3), p. 263-276, 1985.
- GONÇALVES TCM, VICTORIO VMN, JURBERG J, CUNHA V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) I. Resistência ao jejum. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 84 (1), p. 131-134, 1989.
- GONÇALVES TCM, VICTORIO VNM, JURBERG J, CUNHA V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) I. Ciclo evolutivo. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 83, p. 519-523, 1988.
- GONTIJO ED, ANDRADE GMQ, SANTOS SE, GALVÃO LMC, MOREIRA EF, PINTO FS, DIAS JCP, JANUÁRIO JN. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. Epidemiol Serv Saúde, v.18(3), p. 243-254, 2009.
- GUMIEL M. Estudos morfométricos de *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) coletadas no intradomicílio nos Estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro. Curso de Entomologia Médica – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, [Especialização], 2008.
- GURGEL-GONÇALVES R, GALVÃO C, COSTA J, PETERSON AT. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. J Trop Med, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- HUTCHESON HJ, OLIER JHJR, HOUCK MA, STAUSS RE. Multivariate morphometric discrimination of nymphal and adult forms of the blacklegged tick (Acari-Ixididae), a principal vector of Lyme disease in Aestern North America. J Med Entomol, v. 32, p. 827-843, 1995.

- HYPISA V, TIETZ D, ZRZAVY J, REGO RO , Galvão C, JURBERG J. Phylogeny and Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylog Evol*, v. 23, n. 3, p. 447-457, 2002.
- JARAMILLO N, CASTILLO D, WOLFF ME. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97 (5), p. 667-673, 2002.
- JUAREZ E, SILVA EPC. Comportamento do *Triatoma sordida* em condições de laboratório. *Rev Saúde Públ* 16, supl, p. 1-35, 1982.
- JURBERG J, GALVÃO C, NOIREAU F, CARCAVALLO RU, ROCHA DS, LENT H. Uma Iconografia dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol y Vect*, v. 11, n. 1, p. 457-494, 2004.
- JURBERG J. Ferramentas usadas em Taxonomia de Triatomíneos, o uso múltiplo. *Entomol y Vect*, v. 10, p. 497-509, 2003.
- JURBERG J, GONÇALVES TCM, COSTA JM, SOUZA W. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 81(1), p. 111-120, 1986.
- JURBERG J, ROCHA DS, LOROSA ES, VINHAES M, LENT H. Uma nova espécie de *Triatoma* do estado do Rio Grande do Sul (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol y Vect*, v. 5 (6), p. 295-310, 1998.
- JURBERG J, SILVA MBA, GALVÃO C, ROCHA DS, BARBOSA HS, CARCAVALLO R. Descrição dos ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 vistos através de microscopia óptica e eletrônica de varredura (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97 (2), p. 209-216, 2002.
- JURBERG J. A taxonomia dos Triatomíneos baseada nas estruturas fálicas (Hemiptera, Reduviidae). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, [Tese], 59p, 1996.
- LENT H, WYGODZINSKY P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull American Mus Nat Hist*, v. 163, p. 125-520, 1979.
- LENT H. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. *Rev F de Medicina*, v. 6, p. 3-13, 1942.
- LOROSA ES, JURBERG J, SOUZA ALA, VINHAES MC, NUNES IM. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol y Vect*, v. 7 (3), p. 287-296, 2000a.
- LOROSA ES, NUNES IM, VINHAES MC, ANDRADE RE, JURBERG J. Preferência alimentar de algumas espécies de Triatomíneos capturados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. *Entomol y Vect*, v. 7 (2), p. 211-225, 2000b.

- LUCENA DT. Ecologia dos triatomíneos do Brasil. Rev Bras Malar, v. 11, p. 577-635, 1959.
- LUTZ A, ARAUJO HCS, FILHO OF. Viagem científica no Rio Paraná e a Assuncion com volta por Buenos Aires Montevideu e Rio Grande. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 10, p. 104-173, 1918.
- LUZ C, FARGUES J, GRUNEWALD J. Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under constant and cyclic conditions of temperature and humidity. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94, p. 403-409, 1999.
- MARCHON-SILVA V, COSTA J, RIBEIRO R, DIOTAIUTI L. Dados preliminares sobre a infestação concomitante de *Triatoma brasiliensis*, *T.sordida*, *T. pseudomaculata* e *Rhodnius neglectus*. Rev Soc Bras Med Trop, v. 31, p. 181, 1998.
- MARTÍNEZ-IBARRA JA, KATTHAIN-DUCHATEAU G. Biology of *Triatoma pallidipennis* (Stål, 1872) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94 (6), p. 837-840, 1999.
- MARTINS LPA, CASTANHO REP, CASANOVA C, CARAVELAS DT, FRIAS GT, RUAS-NETO AL, ROSA JA. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. Rev Soc Bras Med Trop, v. 39 (2), p. 198-202, 2006.
- MATIAS A, RIVA JX DE LA, TORREZ M. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96 (7), p. 947-950, 2001.
- MENEGUETTI DUO, TREVISAN O, ROSA RM, CAMARGO LMA. First report of *Eratyrus mucronatus*, Stål, 1859, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), in the State of Rondônia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v. 44(4), p. 511-512, 2011.
- MONTEIRO FA, PEREZ R, PANZERA F, GALVÃO C, ROCHA D, NOIREAU F, DUJARDIN J, SCHOFIELD C, BEARD B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94, p. 228-238, 1999.
- MORAES RG. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Parasitologia e Micologia Humana – 4 ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, p. 753, 2000.
- MORAES-SOUZA H, FERREIRA-SILVA MM. O controle da transmissão transfusional. História sobre a Doença de Chagas no Brasil, v. 44 (Supl II), p. 64-67, 2011.
- MOREIRA CJC, SPATA MCD. Dynamics of evolution and resistance to starvation of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Reduviidae: Triatominae), submitted to two different regimens of food deprivation. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97 (7), p. 1049-1055, 2002.
- MS - Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1530](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530). Acesso em: 22/09/2012.

- NEIVA A, PINTO C, LENT H. Notas sobre triatomídeos do Rio Grande do Sul e descrição de uma nova espécie. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 34 (4), p. 607-610, 1939.
- NEIVA A, PINTO C. De um novo hemíptero hematófago brasileiro (*Triatoma fluminensis* nov. sp.). Brasil-Médico, v. 36, p. 402-403, 1922.
- NEIVA A, PINTO C. Estado actual dos conhecimentos sobre o gênero *Rhodnius* Stal, com a descrição de uma nova espécie. Brasil Med, v. 37, p. 20-24, 1923.
- NEIVA A. Informações sobre a biologia da Vinchuca, *Triatoma infestans* Klug. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 5, n. 1, p. 24-31, 1913.
- NOIREAU F, BRENIÈRE F, CARDOZO L, BOSSENO MF, VARGAS F, PEREDO C, MEDINACELLI M. Current spread of *Triatoma infestans* at the expense of *Triatoma sordida* in Bolivia. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 91, p. 271-272, 1996.
- OBARA MT, ROSA JA, CERETTI W, URBINATTI PR, QUINTERO LO, BARATA JMS, GALVÃO C, JURBERG J. A study of the scutellum in eight Chagas disease vector species from genus *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) using optical and scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102(4), p. 463-468, 2007.
- OLIVEIRA G. Isolamento do *Trypanosoma cruzi* e outras noções concernentes à moléstia de Chagas no Rio Grande do Sul (nota prévia). Brasil Med, v. 34, n. 9, p. 142-143, 1920.
- OPAS - Organización Panamericana de la Salud. Disponível em: [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=es](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=es). Acesso em: 20/09/2012.
- OSCHEROV EB, BAR ME, DAMBORSKY MP, MILANO AMF. Estadísticos poblacionales de *Triatoma rubrovaria* en condiciones de laboratorio. Rev Saúde Pública, v. 39, n. 2, p. 211-216, 2005.
- OSCHEROV EB, BAR ME, DAMBORSKY MP, MILANO AMF. Tablas de vida de fecundidad de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Heteroptera: Reduviidae) em condiciones experimentales. In: Jornadas de Comun. Cient. y Tecnol. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina, 2004.
- PACHECO RS, ALMEIDA CE, COSTA J, KLISIEWICZ DR, MAS-COMA S, BARGUES MD. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). Ann Trop Med Parasitol, v. 97, p. 757-768, 2003.
- PACHECO RS, ALMEIDA CE, KLISIEWICZ DR, COSTA J, PIRES MQ, PANZERA F, BAR ME, MAS-COMA S, BARGUES MD. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. Parasite v. 14, p. 231-237, 2007.

- PAPAVERO N, MARTINS UR. Itens da publicação taxonômica. In: *Fundamentos práticos de taxonomia zoológica* (N. Papavero org.), São Paulo: Fundação Editora UNESP (FEU), p. 69-106, 1994.
- PAULA AS, DIOATIUTI L, SCHOFIELD CJ. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mol Phyl Evol*, v. 35, p. 712-718, 2005.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A, MULLER CA, MOREIRA CJC. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiosis of hosts with Chagas' disease. 3. On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saúde Pública*, v. 22, p. 390-400, 1988.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A. Laboratory colonies of Triatominae, biology and population dynamics. *Scien Publ PAHO*, v. 318, p. 63-82, 1976.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A. Estudos sobre a biologia do *Triatoma infestans*, o principal da doença de Chagas no Brasil (importância de algumas de suas características biológicas no planejamento de esquemas de combates a esse vetor). *Rev Bras Malariol Doen Trop*, v. 21, p. 117-159, 1969.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A. Ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* em condições de laboratório. *Rev Bras Malar*, v. 5, p. 35-47, 1953.
- PINTO C. Biologia do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Sciência Médica*, v. 2, p. 541-543, 1924.
- PINTO C. Tripanosomiasis cruzi (doença de Chagas) no Rio Grande do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 37, p. 443-537, 1942.
- PINTO C. Valor do rostrum e das antenas na caracterização dos triatomíneos. *Boletim Biológico*, v. 19, p. 45-137, 1931.
- RABINOVICH JE. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. *J Med Ent*, v. 9, p. 351-370, 1972.
- ROCHA CS. Variabilidade genética de três colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), (Hemiptera, Reduviidae), oriundas do Estado do Rio Grande do Sul, avaliadas por meio do sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e ribossomal. UNESP, Araraquara, [Dissertação], 94p, 2009.
- ROCHA DS, PATTERSON J, SANDOVAL CM, JURBERG J, ANGULO VM, ESTEBAN L, GALVAO C. Description and ontogenetic morphometrics of nymphs of *Belminus herreri* Lent & Wygodzinsky (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Neotrop Entomol*, v. 34 (3), p. 491-497, 2005.
- ROCHA DS, SANTOS CM, CUNHA V, JURBERG J, GALVAO C. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99 (6), p. 591-595, 2004.

- ROCHA DS, JURBERG J, CARCAVALLO RU, PRESGRAVE OAF, CUNHA V, GALVÃO C. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. Rev Saúde Pública, v. 35 (4), p. 400-406, 2001.
- ROCHA DS, GALVÃO C, JURBERG J. Biologia do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 89, p. 265- 270, 1994.
- RODRIGUES VLCC, FILHO ANF, SILVA EOR. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843): tábua das ninfas, duração das formas e oviposição das fêmeas. Rev Soc Bras Med Trop, v. 38 (3), p.: 251-254, 2005.
- ROSA JA, BARATA JM, SANTOS JLF, CILENSE M. Morfologia dos ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Rev Saúde Pública, v. 34 (5), p. 538-542, 2000.
- ROSA JA, BARATA JMS, CILENSE M, NETO FMB. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Int J Insect Morphol Embriol, v.28, p. 363-375, 1999.
- ROSA JA, MENDONÇA VJ, ROCHA CS, GARDIM S, CILENSE M. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105(3), p. 286-292, 2010.
- ROSA JA, MENDONÇA VJ, ROCHA CS, GARDIM S, OLIVEIRA J, NASCIMENTO JD, PINTO MC, CILENSE M, ALEMIDA CE, GALVÃO C, BARATA JM. Estudo da genitália externa feminina de 12 espécies de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) por microscopia eletrônica de varredura. In: Anais da 27ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos, p.26, 2011.
- ROSA JA, ROCHA CS, GARDIM S, PINTO MC, MENDONÇA VJ, FERREIRA-FILHO JCR, CARVALHO EOC, CAMARGO LMA, OLIVEIRA J, NASCIMENTO JD, STEINDEL M, ALMEIDA CE. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. Zootaxa, v. 3478, p. 62-76, 2012.
- ROSA JA. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de 1º e de 5º estádios de *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, [Tese], 1995.
- RUAS-NETO AL, CORSEUIL E, CAVALLERI A. Development of rupestrian triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following hemolymphagy on blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. Entomol y Vect, v. 8 (2), p. 205-216, 2001.
- RUAS-NETO AL, CORSEUIL E. Hábitos, Distribuição Geográfica e Potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Entomol y Vect, v. 9 (2), p. 231-249, 2002.



- RUAS-NETO AL. Aspectos morfológicos, distribuição geográfica, hábitos e importância vetorial de *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), triatomíneos rupestres do Rio Grande do Sul (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, [These], 108p, 2002.
- SAINZ AC, MAURO LV, MORIYAMA EN, GARCIA BA. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, v. 121, p. 229-40, 2004.
- SALVATELLA R, BASMADJIAN Y, ROSA R, MARTINEZ M, MENDARO G, CIVILA E. Hallazgo de *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (Hemiptera, Triatominae) en el estado brasileño de "Rio Grande do Sul". *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.33, n.1, p.1-5, 1991.
- SALVATELLA R, BASMADJIAN Y, ROSA R, PUIME A. *Triatoma delpontei* Romaña & Abalos, 1947 (Hemiptera, Triatominae) en el estado brasileño de "Rio Grande do Sul". *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.35, n.1, p.73-76, 1993.
- SALVATELLA R, CALEGARI L, PUIME A, BASMADJIAN Y, ROSA R, GUERRERO J, MARTINEZ M, MENDARO G, BRIANO D, MONTERO C. Feeding pattern of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) in peridomestic habitats, of a rural area of Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 36, p. 311-320, 1994.
- SALVATELLA R, ROSA R, BASMADJIAN Y, PUIME A, CALEGARI L, GUERRERO J, MARTINEZ M, MENDARO G, BRIANO D, MONTERO C, WISNIVESKY-COLLI C. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 325-328, 1995.
- SANTOS CM, JURBERG J, GALVÃO C, MARTÍNEZ M. Morfometria comparada de *Triatoma infestans*, *T. rubrovaria* e *T. platensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Uruguai. *Iheringia. Série Zoologia*, v. 99, p. 56-60, 2009.
- SANTOS-MALLET JR, JUNQUEIRA ACV, CARVALHO-MOREIRA CJ, ANDRADE Z, COURA JR, GONÇALVES TCM. Morphobiological aspects of *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) from the Upper and Middle Negro River, Amazon region of Brazil. I- Scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 915- 923, 2005.
- SCHACHTER-BROIDE J, DUJARDIN JP, KITRON U, GURTLER RE. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol*, v. 41(4), p. 643-649, 2004.
- SCHAEFER CW. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others. *Neotrop Entomol*, v. 32, p. 1-10, 2003.
- SCHMUNIS GA. A Tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* (Z. Brener, A. A. Andrade & M. Barral-Netto, org.), Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora, p. 1-15, 1999.

- SCHOFIELD CJ, DOLLING WR. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: Lane, R.P; Crosskey, R.W. (Eds.), *Medical Insects and Arachnids*. Chapman and Hall, London, UK, p. 483–516, 1994.
- SCHOFIELD CJ, GALVÃO C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, p. 88–100, 2009.
- SCHOFIELD CJ, JANNIN J, SALVATELLA R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, v. 22, p. 583-588, 2006.
- SCHOFIELD CJ. Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Ann Soc Belge Med Trop*, v. 65, p. 149-164, 1985.
- SCHOFIELD CJ. Biosystematics of the Triatominae, *In: Service M.W. (Ed.). Biosystematics of Haematophagous Insects*. Oxford: Clarendon Press, p. 281-312, 1988.
- SCHOFIELD CJ. *Triatominae: Biology and Control*. Eurocommunica Publ., Bognor Regis, UK, 80 p, 1994.
- SCHOFIELD CJ, DIOTAIUTI L, DUJARDIN JP. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl 1), p. 375-378, 1999.
- SEREBRENICK S. Distribution géographique des triatomidées dans la vallée du São Francisco et ses rapports avec les conditions climatiques. *An Ins Me Trop*, v. 16 (Supl. 7), p. 133-149, 1959.
- SHERLOCK IA, SERAFIM EM. Fauna Triatominae do Estado da Bahia. I — As espécies e distribuição geográfica. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 6, p. 265-300, 1972.
- SILVA IG, SILVA HHG. Suscetibilidade de 11 espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) à cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Rev Bras Ent*, v. 37, p. 459-463, 1993.
- SILVA IG. Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) e no xenodiagnóstico., Universidade Federal do Paraná, [Tese], 169p, 1985.
- SILVA MBA, BARBOSA HS, CARCAVALLO RU, GALVÃO C, JURBERG J. Placas apicais do lábio das ninfas de 1º estágio de *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 e *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae), vetores da doença de chagas. *Entomol y Vect*, v. 6, p.663-668, 1999.
- SILVA MBA, BARBOSA HS, GALVÃO C, JURBERG J, CARCAVALLO RU. Comparative study of the stridulatory sulcus, buccula and rostrum of the nymphs of *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 and *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 by scanning electron microscopy (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98 (3), p. 335-344, 2003.
- SILVA MBA, BARBOSA HS, JURBERG J, GALVÃO C, CARCAVALLO RU. Comparative ultrastructural analysis of the antennae of *Triatoma guazu* and

- Triatoma jurbergi* during the nymphal stage development (Hemiptera, Reduviidae). J Med Entomol, v. 39, p. 705-715, 2002.
- SILVA MBA, JURBERG J, GALVÃO C, CARCAVALLO RU. Estudo morfológico e morfométrico de ovos e ninfas de *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) vistos por microscopia óptica e eletrônica de varredura. Entomol y Vect, vol. 7 (3), p. 311-334, 2000.
- SILVEIRA AC, FEITOSA VR, BORGES R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. Rev Bras Malariol D Trop, v. 36, p. 15-312, 1984.
- SILVEIRA AC, REZENDE DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, v. 27(suppl. III), p. 11-22, 1994.
- SILVEIRA AC. O controle vetorial da doença de Chagas no Brasil. In: CJ Schofield, JP Dujardin, J Jurberg (eds). Proceedings Internacional Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, p. 89-94, 1995.
- SILVEIRA AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. Cad Saúde Pública, v. 16, p. 35-42, 2000.
- SOARES RPP, EVANGELISTA LG, LARANJA LS, DIOTAIUTI. Population dynamics and feeding behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, main vectors of Chagas disease in northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 95 (2), p. 151-155, 2000.
- SOARES RP. Aspectos Biológicos, Bioquímicos e Morfológicos relacionados a Atividades de Vôo das Principais Espécies Vetoras da Doença de Chagas no Brasil. Universidade Federal de Minas Gerais, [Dissertação], 94 p, 1997.
- TEVES-NEVES SC. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins. Fundação Oswaldo Cruz, [Dissertação], 79p, 2012.
- TORRICO F, ALONSO-VEGA C, SUAREZ E, RODRIGUEZ P, TORRICO MC, DRAMAIX M. Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg, v. 70(2), p. 201-209, 2004.
- USINGER RL, WYGODZINSKY P, RYCKMAN RE. The biosystematics of Triatominae. Ann Rev Entomol, v. 11, p. 309-330, 1966.
- VAZQUEZ-PROKOPEC GM, CECERE MC, CANALE DM, GÜRTLER RE, AND KITRON U. Spatiotemporal Patterns of Reinfestation by *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in a Rural Community of Northwestern Argentina. J Med Entomol, v. 42(4), p. 571-581, 2005.
- VINHAES MC, DIAS JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Pública, v. 16(2), p. 7-12, 2000.

WHO - World Health Organization. Chagas disease. Disponível em: [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/). Acesso em: 20/09/2012.

ZELEDÓN R. Effects of triatomine behavior on trypanosome transmission. In: International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research, Belo Horizonte, 1975. Proceedings. Washington, D. C., Pan American Health Organization, p. 326-9. (PAHO - Scient. publ., 318), 1976.

ZELEDON R, GUARDIA VM, ZUNIGA A, SWARTZWELDER JC. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. J Med Entomol, v. 7, p. 313-319, 1970.

## **ANEXOS**

De: "Rider, David" <David.Rider@nds.u.edu>  
Assunto: RE: article submission  
Data: Qui, 27 de Set, 2012 12:42 pm  
Para: "Jacenir Mallet" <jacenir@ioc.fiocruz.br>

---

Jacenir,

I have received your manuscript, and I was able to open all three files. I will solicit reviews from at least three of our colleagues. Once I receive their recommendations, I will forward them on to you. Let me know if you have any questions.

DAR

**From:** Jacenir Mallet [mailto:jacenir@ioc.fiocruz.br]  
**Sent:** Wednesday, September 26, 2012 11:47 AM  
**To:** Rider, David  
**Subject:** article submission

Dear Dr David Rider

I would like to submit the article "Ultrastructure and morphometry of eggs of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carvalhoi* Juberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stal, 1895) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae)" for your consideration, with the aim of publication in this journal. That article has not been published previously and it is not under consideration for publication. The corresponding author is:

Jacenir Reis dos Santos- Mallet  
Laboratório de Transmissores de Leishmanioses - IOC  
Pavilhão Carlos Chagas, 5º andar Sala 16  
Tel: 55 21 2209-3122  
E-mail: jacenir@ioc.fiocruz.br

Sincerely

Jacenir Mallet  
Pesquisadora Titular  
Chefe do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses  
Setor de Entomologia Médica e Forense  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ  
Pavilhão Carlos Chagas - 5º andar - sala 16  
21045-900 - Rio de Janeiro - RJ  
Tel: +55 (21) 2562-1232

\* jacenir@ioc.fiocruz.br  
jacemallet@gmail.com

---

**Attachments:**

<b>untitled-1</b>	
Size:	1.5 k
Type:	text/plain

