

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



TESE

**COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DOS ESPERMATOZOIDES EM ESPÉCIES DO
GÊNERO TRIATOMA (HEMIPTERA, REDUVIIDAE,
TRIATOMINAE)**

MARIA LUIZA RIBEIRO DE OLIVEIRA

2019



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

COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DOS ESPERMATOZOIDES EM ESPÉCIES DO GÊNERO
TRIATOMA (HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE)

MARIA LUIZA RIBEIRO DE OLIVEIRA

Sob a Orientação da Doutora da Jacenir Reis dos Santos Mallet

e Co-orientação da Doutora Simone Freitas

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduaçã em Biologia Animal, na área de concentração Biodiversidade Animal.

Seropédica, RJ.
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R49c RIBEIRO DE OLIVEIRA, MARIA LUIZA, 14/07/1989-
COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DOS ESPERMATOZOIDES EM ESPÉCIES DO GÊNERO
TRIATOMA (HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE) / MARIA
LUIZA RIBEIRO DE OLIVEIRA. - 2019.
76 f. : il.

Orientadora: JACENIR SANTOS MALLET.
Coorientadora: SIMONE FREITAS.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, BIOLOGIA ANIMAL, 2019.

1. MORFOLOGIA SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO. 2.
ESPERMATOZOIDES. 3. SUBCOMPLEXO rubrovaria. I. SANTOS
MALLET, JACENIR , 03/04/1957-, orient. II. FREITAS,
SIMONE, -, coorient. III Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. BIOLOGIA ANIMAL. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código
de Financiamento 001

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

MARIA LUIZA RIBEIRO DE OLIVEIRA

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:

Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet - IOC, Fiocruz, RJ
(Orientadora)

Dra. Ângela Alves de Almeida – ITR, UFRRJ, RJ

Dra. Alice Helena Ricardo da Silva - IOC, Fiocruz, RJ

Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva – UNIRIO, RJ

Dr. Cleber Galvão – IOC, Fiocruz, RJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a vida, pela oportunidade de passar por essa experiência acadêmica que é o Doutorado.

À UFRRJ e a CAPES por proporcionar e financiar. À FIOCRUZ por abrigar.

À Dra. Jacenir Mallet, por orientar em todos os sentidos, pedagógicos, morais, sociais e sentimentais.

À Dra. Simone Freitas, por sentar comigo nas horas mais difíceis e me ensinar o que realmente é escrever para ser uma boa profissional.

À todos do laboratório LIVEDH pelo apoio nos experimentos e nas conversas. Em especial a Dra. Nathanielly Rocha, minha amiga e companheira de campo.

À minha Mãe Silvana, que quando eu pensava não ser digna, me mostrava a realidade. Dizendo que: “pobre tem que estudar...”.

E ao Cristiano, meu amigo, eterno namorado, pai do meu DOM, que esteve comigo quando eu pensei em desistir...

RESUMO

Os espermatozoides estão entre os mais diversos tipos de células, e sua morfologia frequentemente fornece dados que podem ser usados para avaliar as relações filogenéticas. Eles também podem ajudar a esclarecer a natureza de “complexos específicos”, que são comuns entre os triatomíneos. No presente estudo, avaliamos o comportamento de cópula de *Triatoma rubrovaria* e a morfologia estrutural de espermatozoides de *T. carcavalloei*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*. O comportamento copulatório foi descrito a partir do momento em que machos e fêmeas juntaram as genitálias até se separarem. A inseminação foi confirmada pela presença de um espermatóforo na bolsa copulatória da fêmea. Para medir seus espermatozoides, os machos foram dissecados e suas vesículas seminais removidas, esmagadas em lâminas de vidro e então os espermatozoides foram espalhados, fixados e observados sob um fotomicroscópio. As imagens obtidas foram analisadas para medir o espermatozoide. Vesículas seminais também foram preparadas para microscopia eletrônica de transmissão. Realizamos K-means de agrupamento separadamente para cada espécie para agrupar seus espermatozoides com base na morfologia. As diferenças no comprimento dos espermatozoides entre as espécies de Triatominae, os tipos de espermatozoides e a interação entre as espécies e o tipo de espermatozoide foram avaliadas com uma análise de variância (ANOVA). O tempo de cópula em *T. rubrovaria* foi de 3 a 5 min, tempo suficiente para a transferência do espermatóforo. Todos os táxons apresentaram espermatozoides polimórficos (curtos e longos), com diferenças significativas nos comprimentos entre os táxons. Usando microscopia eletrônica, descobriu-se que as células espermáticas dos quatro táxons examinados tinham morfologia ultraestrutural similar, confirmando a hipótese de sinapomorfias de espermatozoides dentro da subordem Heteroptera.

Palavras-Chave: subcomplexo *Triatoma rubrovaria*, inseto vetor, reprodução, sistema reprodutor masculino

ABSTRACT

Spermatozoa are among the most diverse cell types, and their morphology often data that can be used to reliably evaluate phylogenetic relationships. They can also help to clarify the nature of “specific complexes”, which are common among triatomines. In the present study, we evaluated the copulation behavior of *Triatoma rubrovaria* and the structural morphology of sperm from *T. carcavalloei*, *T. infestans*, *T. pintodiasi*, and *T. rubrovaria*. Copulatory behavior was described from the moment males and females genitalia joined until they separated. Insemination was confirmed by the presence of a spermatophore in the female’s bursa copulatrix. To measure their sperm, males were dissected and their seminal vesicles were removed, squashed on glass slides, and then spread, fixed, and observed under a photomicroscope. The images obtained were analyzed to measure the sperm. Seminal vesicles were also prepared for transmission electron microscopy. We performed K-means clustering separately for each species to group their sperm based on morphology. The differences in spermatozoa length among species of Triatominae, sperm types, and the interaction between species and sperm type were assessed with a two-way analysis of variance (ANOVA). The copulation time in *T. rubrovaria* was 3 to 5 min, which was sufficiently long for spermatophore transfer. All taxa showed polymorphic (short and long) sperm, with significant differences in the lengths of sperm among taxa. Using electron microscopy, the sperm cells of the four taxa examined were found to have similar ultrastructural morphology, confirming the hypothesized synapomorphies of sperm within the suborder Heteroptera.

Keywords: *Triatoma rubrovaria* subcomplex; insect vector; male reproductive system; reproduction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Triatoma carcavallo</i>	22
Figura 2: <i>Triatoma infestans</i>	23
Figura 3: <i>Triatoma pintodiasi</i>	25
Figura 4: <i>Triatoma rubrovaria</i>	26
Figura 5: Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino da subfamília Triatominae	28
Figura 6: Mapas do Estado do Rio Grande do Sul.....	32
Figura 7: Foto de coleta em ambiente natural	33
Figura 8: Foto das colônias em laboratório	34
Figura 9: Sistema reprodutor feminino de <i>Triatoma infestans</i> na cavidade abdominal..	36
Figura 10: Esquema dos espermatozoides dos três membros do subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i> e do <i>Triatoma infestans</i>	40
Figura 11: Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides dos três táxons do subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i>	43
Figura 12: Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de cada macho dos três táxons do subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i>	43
Figura 13: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de <i>T. carcavallo</i>	45
Figura 14: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de <i>T. infestans</i>	46
Figura 15: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de <i>T. pintodiasi</i>	46
Figura 16: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de <i>T. rubrovaria</i>	46
Figura 17: Boxplots exploratórios das medidas das quatro espécies, de acordo com a classificação via K-means	48

Figura 18: Electromicrografia dos espermatozoides de <i>T.carcavalloi</i> em corte transversal.	49
Figura 19: Electromicrografia dos espermatozoides de <i>T.carcavalloi</i> em corte transversal.	50
Figura 20: Electromicrografia do flagelo do espermatozoide de <i>T.rubrovaria</i> em corte transversal. Em destaque o axonema e as três regiões dos derivados mitocondriais.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides dos três táxons do subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i>	41
Tabela 2: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de <i>T. carcavallo</i>	45
Tabela 3: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de <i>T. infestans</i>	45
Tabela 4: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de <i>T. pintodiasi</i>	46
Tabela 5: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de <i>T. rubrovaria</i>	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Média total das frequências de medidas dos espermatozoides das três espécies do subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i>	42
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A cópula em insetos.....	14
1.2 Os Triatomíneos.....	15
1.3 Subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i>	18
1.4 Posição Sistemática das espécies estudadas.....	21
1.5 <i>Triatoma carcavallo</i> i.....	22
1.6 <i>Triatoma infestans</i>	23
1.7 <i>Triatoma pintodiasi</i>	25
1.8 <i>Triatoma rubrovaria</i>	26
1.9 Morfologia do Sistema Reprodutor Masculino de Triatominae.....	27
1.10 Morfologia dos espermatozoides.....	28

2. OBJETIVOS

2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos.....	31

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo.....	32
3.2 Obtenção e criação dos insetos.....	33
3.3 Comportamento de cópula.....	34
3.4 Morfometria dos espermatozoides.....	36
3.5 Análises estatísticas.....	37
3.6 Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides.....	38

4. RESULTADOS

4.1 Comportamento de cópula.....	39
4.2 Morfometria dos espermatozoides.....	40
4.3 Análises estatísticas.....	41
4.4 Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides.....	48
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. ANEXO	
8.1 Spermatological morphology in <i>Triatoma</i> species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 A cópula em insetos

Grande parte do sucesso adaptativo dos insetos deve-se a características de sua reprodução e desenvolvimento. Os insetos possuem vários tipos de reprodução, a saber, viviparidade, partenogênese, pedogênese, poliembrionia e hermafroditismo, no entanto, a maioria das espécies reproduz-se de maneira sexuada (Nation, 2002). Isso significa que as fêmeas e machos sexualmente maduros devem estar presentes no mesmo local ao mesmo tempo, para que, através do acasalamento, ocorra uma transferência de espermatozoides. Uma vez que a maioria dos insetos se reproduz de maneira sexuada, muitas espécies desenvolveram mecanismos de aproximação entre os sexos. Estes mecanismos podem incluir sinais visuais, sonoros, vibracionais, táteis e/ou sinais químicos (Chapman, 1998).

A comunicação nos insetos, assim como em outros animais, é básica para sua sobrevivência, porém, destaca-se essa importância nos comportamentos sociais e reprodutivos (Gullan & Cranston, 1994). Corte e cópula são exemplos de comportamentos relevantes para a análise evolutiva em insetos (Sillén-Tullberg, 1981). Apesar dos estímulos responsáveis pela atração sexual de muitos insetos serem espécie-específicos, geralmente torna-se necessário um maior período de comportamento de corte entre os parceiros (Chapman, 1982).

Na corte, macho e fêmea trocam sinais intraespecíficos, denominados liberadores sociais (Cunha, 1974). Esses sinais (feromônios) conduzem os insetos a um estado de prontidão fisiológica a partir da qual pode haver cópula (Mayr, 1977; Carthy & Howse, 1980; Sordilho, 1988). A corte é um modo da fêmea escolher ou selecionar o parceiro mais apto para a fertilização de seus ovos (Eberhard, 1991). A razão sexual dentro das

populações de insetos ou mesmo a quantidade de fêmeas “grávidas” ou em prontidão sexual podem afetar a disponibilidade de escolha de uma fêmea, fazendo com que os machos passem a selecionar suas parceiras (Sillén-Tullberg, 1981).

Quando os adultos não se encontram próximos uns dos outros, é frequente que indivíduos de um dos sexos sejam capazes de localizar seus parceiros por meio da comunicação visual, química ou acústica (Lewis, 1984). Usualmente, um dos sexos emite um sinal para atrair o outro sexo, através de sinais semioquímicos. Sinais químicos, especialmente, são mais efetivos para atrair parceiros sexuais a longa distância (Cardé & Bell, 1995; Cardé & Minks, 1997). Após a localização do parceiro, o comportamento de corte pode preceder ou ser parte de um acasalamento. Quando o acasalamento é bem sucedido, a sequência comportamental resultará em transferência de espermatozoides do aparelho reprodutor do macho para o da fêmea (Groot, 2000). Neste sentido, o comportamento de corte e cópula representa uma importante ferramenta na interação dos organismos com o seu ambiente, e compreender esses aspectos facilitam o entendimento de possíveis colonizações domésticas.

1.2 Os Triatomíneos

Hemiptera é uma ordem de insetos paurometábolos distinguidos pelo seu aparelho bucal sugador, sendo composta pelas subordens Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas), Sternorrhyncha (psilídeos, pulgões, cochonilhas) Coleorrhyncha e Heteroptera (percevejos verdadeiros). A subordem Heteroptera, com mais de 40.000 espécies descritas, representa uma das radiações mais bem sucedidas de insetos não-holometábolos (Weirauch & Schuh, 2011).

Dentro de Heteroptera, três características diagnósticas são sinapomórficas: lábio inserido anteriormente na cabeça, ao contrário de posteriormente como em Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha; presença de glândulas metatorácicas nos adultos; e glândulas abdominais dorsais nos imaturos (Weirauch & Schuh, 2011). A maioria das espécies de Heteroptera é fitófaga, se alimentando de seiva e outros sucos produzidos pelas plantas, mas também existem algumas espécies hematófagas, e predadoras, de outros insetos e de outros invertebrados (Triplehorn & Johnson, 2011).

Os insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae), chamados vulgarmente como barbeiros, chupões, chupanças, bicudos, finções ou procotós, são comumente conhecidos das populações rurais de várias regiões do Brasil, constituindo um grupo amplamente distribuído pela Região Neotropical, possuindo 153 espécies descritas, abrigadas em 18 gêneros e cinco tribos (Oliveira & Alevi, 2017; Oliveira et al., 2018; Dorn et al., 2018; Poinar Jr, 2019). O gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 73 espécies, as quais estão agrupadas em oito complexos (Schofield & Galvão, 2009; Justi & Galvão, 2017).

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 ocorra mais de uma dezena fora do continente americano, associada a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, com destaque para os mamíferos e aves (Schofield et al., 1999). As de maior interesse epidemiológico são *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata* (Silveira et al., 1984; Baruffa, 1986; Coura, 1993). Contudo, tem sido dada atenção aos chamados vetores secundários como, *P. geniculatus*, *T. tibiamaculata*, *Rhodnius prolixus*, *R. domesticus* e *T. vitticeps*,

em função do processo de domiciliação vivido por essas espécies (Nascimento et al., 1997).

No ambiente natural os triatomíneos são encontrados em associação com diversos tipos de animais silvestres (Sherlock, 2000) e seu habitat primário está representado por abrigos, tocas e ninhos de animais, como marsupiais, edentados, roedores, carnívoros, morcegos, aves, répteis e anfíbios (Lent & Wygodzinsky, 1979). Zeledón (1974) e Barreto (1976) agruparam as espécies de triatomíneos em silvestres, peridomiciliares e domiciliares. As espécies silvestres, que são a maioria, vivem no habitat natural e podem invadir, esporadicamente, o peridomicílio e o domicílio, colonizando ou não as habitações humanas. As peridomiciliares podem ou não invadir o domicílio, e naquele caso formar colônias, e as domiciliares, embora adaptadas ao domicílio também são encontradas nos outros ambientes.

Embora todas as espécies de triatomíneos sejam vetores em potencial do *Trypanosoma cruzi*, apenas aquelas que colonizam o domicílio e ou peridomicílio reúnem condições necessárias para transmitir este parasito (Silveira, 2000), uma vez que encontram-se próximos ao homem. Os triatomíneos apresentam relevante importância epidemiológica devido à necessidade de exercerem o hematofagismo obrigatório sobre os vertebrados, em todas as fases de desenvolvimento, fator determinante da aproximação dos triatomíneos com mamíferos silvestres e/ou homem, caracterizando assim o ciclo enzoótico ou uma zoonose (Coura, 2013).

O estudo dos triatomíneos silvestres tem contribuído para o conhecimento dos seus ecótopos naturais, do mecanismo de interação entre o ecótopo natural e artificial, e da sua associação com hospedeiros vertebrados, possibilitando o entendimento da circulação do parasito *T. cruzi* entre esses ambientes, e do eventual estabelecimento ou restabelecimento do ciclo doméstico de transmissão (Lorosa et al., 2008).

1.3 Subcomplexo “*Triatoma rubrovaria*”

Alguns grupos de insetos apresentam grande similaridade morfológica, e para diagnose específica são necessárias técnicas taxonômicas 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). Assim, Schofield & Galvão (2009) redefiniram os complexos do gênero *Triatoma* e dividiram em oito subcomplexos.

O complexo *T. infestans* atualmente compreende seis subcomplexos: *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. matogrossensis*, *T. rubrovaria*, *T. sordida*. O subcomplexo “*Triatoma rubrovaria*” é, atualmente, composto por sete espécies: *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* (Jurberg et al., 2013). No Estado do Rio Grande do Sul, as espécies mais encontradas em ambientes peridomiciliar e domiciliar após a eliminação do *T. infestans* no domicílio são: *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* (Almeida et al., 2009; Costa & Lorenzo, 2009; Santos et al., 2009; Cardozo-de-Almeida, 2012).

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, responsável por 80% dos casos de transmissão vetorial no Brasil (Noireau et al., 1996; Monteiro et al., 1999; Almeida et al., 2008). No Rio Grande do Sul, o programa de controle da 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.

Segundo Silva (1985), o pouco conhecimento acerca da biologia, ecologia e morfologia das espécies de triatomíneos silvestres não desmerece a importância epidemiológica destas, uma vez que espécies como *T. carvalhoi* e *T. circummaculata* habitam ambientes rochosos onde a presença das fontes de alimento é intermitente, desenvolvendo grande capacidade de resistência ao jejum com acentuado ecletismo alimentar.

No Brasil, os inquéritos entomológicos demonstraram que 17 espécies foram registradas em ambientes domésticos, com graus variados de colonização e de infecção natural (Costa et al., 2003). Uma dessas espécies é *T. rubrovaria*, que passou a ser o triatomíneo mais capturado na Região Sul, de acordo com os dados fornecidos pelo Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) da antiga FNS, hoje FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), do Rio Grande do Sul, entre 1975 e 1997, indicando um crescente processo de invasão domiciliar e peridomiciliar dessa espécie (Almeida et al., 2000; 2005).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2019), entre 2007 e 2011 foram registrados mais de 770.000 triatomíneos capturados em todo território brasileiro por meio da vigilância entomológica passiva ou ativa dos estados. Dentre as 62 espécies distribuídas entre o intradomicílio e peridomicílio destacam-se as seguintes espécies de importância epidemiológica: *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *P. megistus*, *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. pictipes*, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. rubrovaria*, *T. rubrofasciata*, *T. sordida* e *T. vitticeps*. Destes, foram examinados para identificação da infecção por *T. cruzi* 76,8% dos capturados, resultando numa taxa de infecção natural total de 2,7%. Dos 54,5% exemplares de *T. rubrovaria* examinados, 5,9% estavam infectados naturalmente pelo *T. cruzi*.

Em relação às principais formas de transmissão ocorridas atualmente no país, 72% foram por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e 18% não identificada (Ministério da Saúde, 2019).

A principal estratégia de controle da Doença de Chagas é a prevenção da transmissão vetorial, a partir da redução ou eliminação de triatomíneos domiciliados utilizando inseticidas e vigilância entomológica, com participação comunitária (Dias et al., 2002; Miles, 2004, Coura & Vinas 2010). Segundo a PAHO (2017), a situação da transmissão vetorial no Estado do Rio Grande do Sul está interrompida pelo principal vetor.

A transmissão oral vem apresentando altos índices entre populações de áreas endêmicas (Cone Sul: Brasil e Argentina) e países do norte da América do Sul (norte do Brasil, Bolívia, Colômbia e Venezuela), com grande importância pela sua frequência, dificuldade de controle, falta de reconhecimento e necessidade de novas estratégias de prevenção. A transmissão pela via oral ocorre principalmente por ingestão de material contaminado com triatomíneos infectados ou suas fezes, ingestão de carne crua, ou mal cozida, ou ainda pelas secreções de alguns mamíferos infectados (Ferreira et al., 2019).

1.4 Posição Sistemática das espécies estudadas

Reino: Animal

Filo: Arthropoda

Subfilo: Atelocerata

Classe: Insecta

Ordem: Hemiptera

Subordem: Heteroptera

Superfamília: Reduvidae

Família: Reduviidae

Subfamília: Triatominae

Tribo: Triatomini

Gênero: *Triatoma* Laporte, 1832

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

Triatoma infestans Klug, 1834

Triatoma pintodiasi Jurberg, Cunha & Rocha, 2013

Triatoma rubrovaria Blanchard, 1843

1.5 *Triatoma carcavalloi* (Fig. 1)

Espécie silvestre e com distribuição geográfica restrita ao Estado do Rio Grande do Sul, vive em simpatria com *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* no perdomicílio e domicílio e foi considerada afim de *T. rubrovaria*.

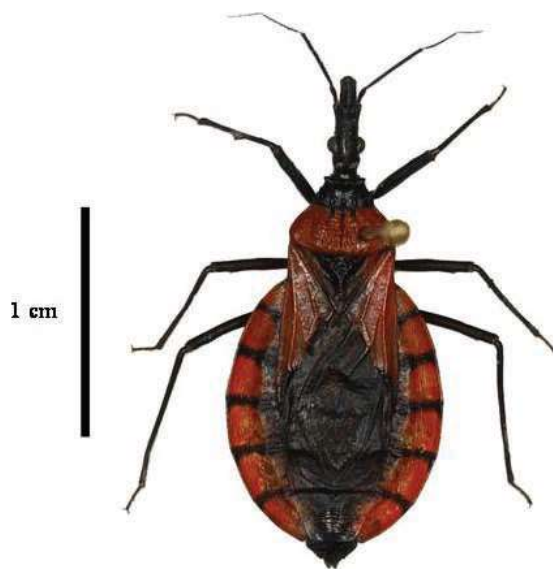


Figura 1: Fêmea de *Triatoma carcavalloi* em vista dorsal. (Fonte: Santos-Mallet et al., 2008)

Segundo Santos-Mallet et al. (2008), *T. carcavalloi* foi descrita com base em quatro fêmeas coletadas no intradomicílio (Juberg et al., 1998), atraídas pela luz, nos municípios de Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão e Dom Feliciano, Estado do Rio Grande do Sul. A espécie 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 rostro, 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). Carcavallo et al. (2001) diz que *T. rubrovaria* pertence ao complexo "infestans" juntamente com a espécie que lhe dá o nome (*T. infestans*), *T. platensis* (Neiva, 1913), *T. delpontei* (Romaña & Abalos, 1947), *T. melanosoma* (Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1947) e *T. carcavalloi*.

Posteriormente, Schofield & Galvão (2009) sugeriram que o "complexo infestans" teria na verdade seis subcomplexos, incluindo o subcomplexo "*T. rubrovaria*", composto na época por seis espécies: *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliveirai* e *T. rubrovaria*.

1.6 *Triatoma infestans* (Fig. 2)



Figura 2: Macho de *Triatoma infestans* em vista dorsal. (Foto: Catarina Macedo)

Considerado um dos principais vetores da Doença de Chagas na América Latina, por ser altamente antropofílico, e facilmente infectado pelo *T. cruzi*. A ampla distribuição de *T. infestans* tem sido associada com a migração humana e espécies mais bem adaptadas ao ambiente intradomiciliar, incluindo fendas nas paredes, telhados, vestuário humano, debaixo das camas e micro-habitats adicionais (Dias, 2006).

Segundo Hernandez et al. (2013), *T. infestans* é encontrada em habitats domésticos rurais de áreas pobres da América do Sul, o que representa um alto risco para a transmissão da doença. Outros habitats são frequentemente infestados pelo *T. infestans* como: galinheiros, currais, gaiolas para coelhos e paióis, que hospedam abundantes populações de vetores a poucos metros de distância das moradias. Os peridomicílios são importantes abrigos destes triatomíneos, criando fontes potenciais de reinfestação e recolonização em domicílios e habitats que foram tratados com inseticidas (Cecere et al., 1997; 2006; Gürtler, 1999; Gurevitz et al., 2013). Além disso, estudos têm demonstrado que áreas com concentração de *T. infestans* há infecção humana frequente (Passos & Silveira, 2011).

1.7 *Triatoma pintodiasi* (Fig. 3)



Figura 3: Macho de *Triatoma pintodiasi* em vista dorsal. (Fonte: Jurberg, et al., 2013)

Essa é a espécie mais recentemente descrita, conhecida até o momento apenas do Rio Grande do Sul, em latitudes próximas a 30° Sul, onde foi encontrada em ambientes pedregosos.

Assim como *T. circummaculata*, pode ser encontrada naturalmente infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, viver abrigada entre as rachaduras de pedras e raramente são coletadas em habitações humanas. Nessas condições, pressupõe-se estarem mais protegidas das intempéries e terem um ciclo biológico mais equilibrado, não só em relação ao micro-habitat, mas também às fontes alimentares, pois ali vivem anfíbios, répteis e artrópodes (Jurberg et al., 2013).

1.8 *Triatoma rubrovaria* (Fig. 4)



Figura 4: Macho de *Triatoma rubrovaria* em vista dorsal. (Foto: Catarina Macedo)

Com ampla distribuição no Uruguai e partes do Nordeste da Argentina, *T. rubrovaria* tem sua presença confirmada no Brasil somente nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul, restringindo a área endêmica da doença de Chagas no Rio Grande do Sul (Rosa et al., 2000). Silveira & Rezende (1994) reconheceram a potencialidade desta espécie em colonizar habitações humanas.

Esta espécie é encontrada, principalmente, entre rochas e sua alimentação é eclética, baseada em uma grande variedade de hospedeiros, incluindo o homem no peridomicílio (Salvatella et al., 1995). Vivendo em locais protegidos, estes triatomíneos sofrem menos com as alterações climáticas acentuadas do sul do continente, visto que temperaturas abaixo de 20° C afetam o metabolismo, a demanda de sangue, o tempo de duração do ciclo vital e alteram a sua reprodução (Casas et al., 1999).

Segundo Almeida et al. (2003) e Bar et al. (2003), *T. rubrovaria* demonstra rapidez na obtenção do alimento e na primeira defecação, características que indicam esta espécie como um eficaz vetor na transmissão da Doença de Chagas.

1.9 Morfologia do Sistema Reprodutor Masculino de Triatominae

O sistema reprodutor masculino de Triatominae apresenta dois testículos ovais pareados, revestidos por uma membrana testicular que engloba os folículos testiculares. Os folículos se conectam ao ducto principal, o vaso deferente, através de vasos eferentes individuais. De cada testículo parte um vaso deferente, e esse canal se dilata em um ponto de sua extensão para formar a vesícula seminal. Associado a esse sistema estão as glândulas acessórias que consistem em quatro lóbulos: anterior, externo, interno e dorsal, que se unem em um ponto, formando o hilo, de onde parte o ducto glandular, que desemboca abaixo do vaso deferente, no ducto ejaculatório (Barth, 1958; Freitas et al., 2010) (Fig. 5).

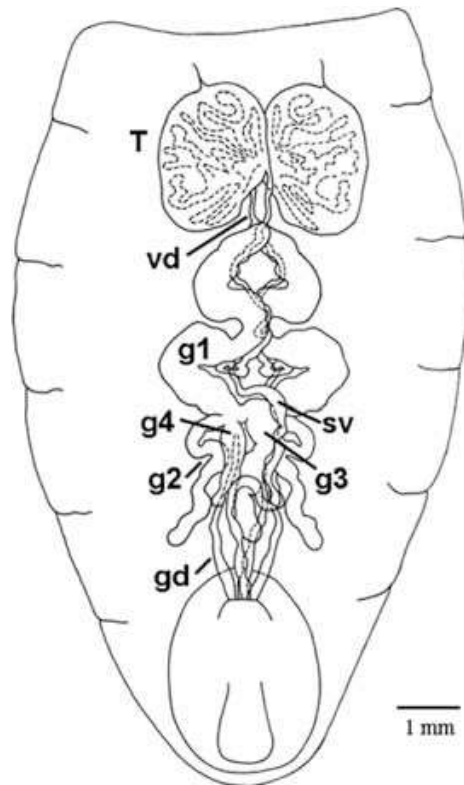


Figura 5: Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de Triatominae. T: testículos, vd: vaso deferente, g1-4: glândulas acessórias, sv: vesícula seminal, gd: ducto glandular. (Fonte: Freitas et al., 2008).

1.10 Morfologia dos espermatozoides

Os espermatozoides estão entre os tipos de célula com maior diversidade, sua morfologia externa e ultraestrutura muitas vezes fornecem dados confiáveis para distinguir taxas e avaliar relações filogenéticas. A maior diversidade destas células é encontrada nos invertebrados, principalmente nos insetos (Jamieson, 1987).

Neste grupo, os espermatozoides são formados pela cabeça e cauda. Grande parte da cabeça é ocupada pelo núcleo. Na frente do núcleo está o acrosoma, estrutura glicoproteica, circundada por membrana com, na maioria dos insetos, uma camada extra acrosomal e uma haste interna ou cone. Esta estrutura está envolvida no reconhecimento

interespecífico esperma-ovo e possivelmente com a lise da membrana do ovo, permitindo a entrada do espermatozoide no mesmo (Chapman, 1998).

A porção motora do flagelo é chamada axonema, localizado na base do núcleo, e é composto por microtúbulos provenientes do centríolo. O espermatozoide da maioria dos Pterygota tem um flagelo com arranjo microtubular 9+9+2 (nove acessórios, nove duplos e dois centrais) (Klowden, 2007). Flanqueando o axonema estão os derivados mitocondriais, os quais, nos Pterygota, geralmente são dois, porém em algumas ordens apresentam-se únicos (Chapman, 1998).

A evolução rápida e divergente do espermatozoide é um padrão generalizado que ocorre em muitos grupos animais. Em alguns grupos, o comprimento e a morfologia do espermatozoide variam até entre espécies afins (Chawanji et al., 2006; Araújo et al., 2011). Um exemplo de diversificação da morfologia do espermatozoide é o polimorfismo espermático, no qual dois ou mais diferentes tipos de espermatozoides são encontrados no ejaculado de um único macho. Esse polimorfismo pode incluir diferenças na morfologia, no comprimento total do espermatozoide, no comprimento de algumas estruturas e na função (Swallow & Wilkinson, 2002).

Em Hemiptera, a produção de espermatozoides polimórficos que diferem quanto ao comprimento da cabeça e/ou do flagelo já foi relatada em Cicadidae (Chawanji et al., 2005; 2006), Pentatomidae (Araújo et al., 2011), Largidae (Araújo et al., 2012). Em relação à morfologia ultraestrutural dos espermatozoides, os estudos são restritos apenas a algumas espécies (Danilova et al., 1984; Afzelius et al., 1985; Lee, 1985; Bão & De-Souza, 1994; Chawanji et al., 2005, 2006, 2007; Araújo et al. 2011, 2012). Recentemente, foi feito o primeiro registro de dimorfismo espermático em Triatominae no complexo "*Triatoma brasiliensis*" (Baffa et al., 2017) sendo considerado como uma estrutura sinapomórfica dentro de Heteroptera, mais uma ferramenta importante para

estudos de complexos de espécie, uma vez que as espécies avaliadas mostraram variações consideráveis entre dentro do complexo “*T. brasiliensis*”.

Os estudos com espermatozoides têm demonstrado uma série de modificações nos diferentes grupos de Hemiptera, suficiente para justificar estudos descritivos que poderão suportar análise de taxonomia, biologia reprodutiva e filogenia entre as subordens de Hemiptera. Para isso há a necessidade de que mais espécies sejam estudadas, preferencialmente que representem o maior número de táxons dentre as subordens de Hemiptera, bem como espécies envolvidas em “complexos e subcomplexos de espécies”.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o comportamento de cópula de *Triatoma rubrovaria* e descrever a morfologia estrutural dos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, buscando possíveis parâmetros relevantes em estudos biológicos, sistemáticos e filogenéticos.

2.2 Específicos

- Avaliar o comportamento copulatório: tempo de cópula e presença de espermatóforo na bolsa copulatória da fêmea de *T. rubrovaria*;

- Realizar a morfometria dos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans* e *T. rubrovaria*, utilizando a microscopia de luz;

- Descrever a ultraestrutura morfológica dos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão;

- Caracterizar os espermatozoides para inferir como marcadores espécie-específicos e sua possível aplicação na diferenciação de complexos de espécie em Triatominae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Os insetos utilizados são provenientes de colônias estabelecidas no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância entomológica em Diptera e Hemiptera, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ, a partir de espécimes procedentes dos municípios de Caçapava do Sul (53°29'12"O; 30°30'58"S), Cachoeira do Sul (30° 20' 49,4"; 052° 45' 04,0" O), Canguçu (31° 23' 58,2"; 052° 43' 06,5" O), Encruzilhada do Sul (30°32'38"S; 52°31'19"O),Lavras do Sul (30° 36' 11,7"; 053° 47' 54,3" O) e São Gerônimo (29° 57' 32"; 051° 43' 19" O), Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Fig. 6).

Foram coletados em Janeiro e Julho de 2017 e 2016.

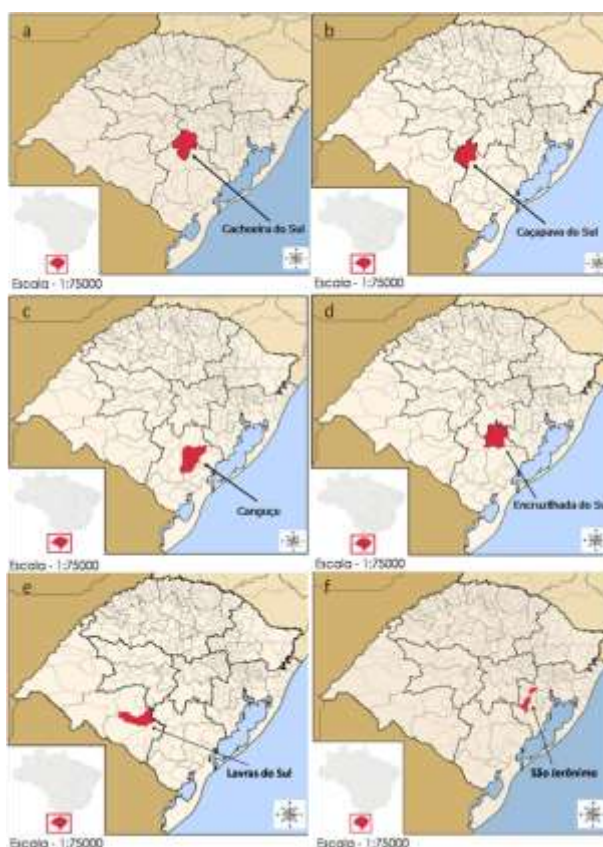


Figura 6: Mapas do Estado do Rio Grande do Sul, destacando-se os municípios de Cachoeira do Sul (a), Caçapava do Sul (b), Canguçu (c), Encruzilhada do Sul (d), Lavras do Sul (e) e São Jerônimo (f).

3.2 Obtenção e criação dos insetos

A coleta dos triatomíneos foi feita com a colaboração de agentes de endemias dos municípios ligados à Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Rio Grande do Sul, com pronta intervenção de controle em caso de infestação. Nos ecótopos naturais, as capturas foram realizadas na periferia imediata (50m, 100m, 150m) dos espaços habitacionais, tais como: rochas, sob cercas rurais, ninhos de pássaros e roedores, ocos de árvores, locas no solo e tocas de animais (Fig. 7). Nos ecótopos artificiais, as capturas foram realizadas no peri e intradomicílio. Neste caso, a investigação ocorreu debaixo de colchões, atrás de quadros, entre os assentos dos sofás e cadeiras, entre outros.



Figura 7: Coleta em ambiente natural.

No laboratório, os insetos foram identificados com base na chave dicotômica segundo Galvão (2015). Colônias estão sendo mantidas no insetário do Laboratório de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Fig. 8). Em condições de laboratório, as colônias são alimentadas semanalmente com

sangue de *Mus musculus* (Protocolo CEUA - FIOCRUZ LW-4/13), e mantidas a 29°C e 80% UR.



Figura 8: Foto das colônias em laboratório.

3.3 Comportamento de cópula

Para este parâmetro, espécimes de *T. rubrovaria* em 5° estágio foram separados do restante da colônia e individualizados em tubos Falcon de 200ml. Este procedimento foi necessário, pois nesta espécie a caracterização sexual em estádios ninfais é complexa e são necessárias fêmeas virgens.

Os cruzamentos foram feitos com casais da mesma localidade (Lavras do Sul) e localidades diferentes (Caçapava do Sul + Encruzilhada do Sul; Caçapava do Sul + Canguçu e Canguçu + Encruzilhada do Sul), coletados no mesmo tipo de ecótopo.

Uma vez individualizados, os insetos foram alimentados por uma hora a cada 15 dias, conforme o procedimento padrão de alimentação do laboratório. Quando estes realizavam a muda para adultos, esperava-se uma semana para que fossem colocados em meio experimental.

Para o monitoramento da cópula foram selecionados aleatoriamente um macho e uma fêmea e, aos pares, colocados em placas de Petri com 15cm de diâmetro, forradas com papel filtro. A descrição do comportamento foi feita a partir do momento em que os casais foram unidos na placa, e a mensuração do tempo foi feita a partir do momento em que houve o acoplamento das genitálias. Caso não acontecesse interesse em 20 minutos, os casais eram separados e voltavam para os tubos até nova tentativa. Ocorrendo a cópula, as fêmeas eram dissecadas para a observação da presença do espermatóforo na bolsa copulatória.

Para as dissecções as fêmeas foram alfinetadas no pronoto com os alfinetes transpassando o corpo e fixados a uma placa de Petri com parafina. Após a retirada das asas, foi feito um corte longitudinal no conexivo, de ambos os lados, para remoção dos tergitos abdominais. Utilizou-se solução fisiológica para inseto (0,7% NaCl + 0,3% KCl) para evitar o ressecamento das estruturas internas. A presença do espermatóforo na bolsa copulatória é evidente quando as estruturas reprodutivas ficam expostas, este pode ser visto como uma estrutura translúcida, arredondada, ocupando todo espaço da bolsa copulatória, caracterizando que a cópula foi bem sucedida (Fig. 9).



Figura 9: Sistema reprodutor feminino de *Triatoma infestans* na cavidade abdominal. BC: bolsa copulatória; Esm: espermateca; Esp: espermatóforo; O: ovo maduro; OL: oviduto lateral; Ov: ovariolo; Tq: traqueíolas. (Foto: Ariane Pereira-Lourenço).

3.4 Morfometria dos espermatozoides

Esta metodologia foi feita em duas etapas:

► Primeira etapa: foram usadas as espécies *T. carcavalloi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

► Segunda etapa: diante dos resultados observados na primeira etapa, foi incluída *T. infestans*. Espécie morfológicamente próxima e componente do complexo ao qual o subcomplexo *Triatoma rubrovaria* faz parte.

Para a mensuração dos espermatozoides, cinco machos de cada espécie foram dissecados e as vesículas seminais extraídas. Em seguida, gotas de suspensão dos

espermatozoides foram espalhadas em lâminas histológicas, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, a temperatura ambiente e, depois, lavadas em água corrente. Após secas, as lâminas foram observadas e fotografadas em Microscópio Zeiss Primo Star, acoplado com câmera Zeiss AxioCam ICc1, em aumento de 40x. As imagens foram analisadas e medidas utilizando o Programa Image-Pro 4.5.

3.5 Análises estatísticas

Na primeira etapa, utilizou-se a Análise de Variância de um fator (one-way ANOVA) para verificar a relação entre o comprimento dos espermatozoides (variável resposta) em cada espécie. Obtendo-se resultado significativo dessas análises, aplicou-se teste de contraste de Tukey para verificar as diferenças dos espermatozoides entre as espécies.

Na segunda etapa, o algoritmo de agrupamento K-means foi realizado para cada espécie separadamente. Este algoritmo é usado para agrupar ou classificar n observações em k grupos definidos a priori, baseados em atributos comuns entre eles (Hartigan & Wong, 1979). A relação entre o comprimento dos espermatozoides, as espécies de Triatominae, o tipo de espermatozoide e a interação entre as espécies e o tipo de espermatozoide foi avaliada por uma análise de variância de duas vias (ANOVA). O procedimento Box-Cox foi utilizado para analisar os dois resultados da ANOVA para verificar a necessidade de transformação dos dados, a fim de atender às premissas de normalidade e homogeneidade das variâncias. Assim, o comprimento dos espermatozoides foi transformado em $-0,3$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando R (R Core Team 2018) e R-Studio (R-Studio Team 2016), com os pacotes "car" (Fox & Weisberg 2011) e "MASS" (Venables & Ripley 2002). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

3.6 Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides

Para o estudo ultraestrutural, cinco machos de *T. carcavalloei*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* foram dissecados, as vesículas seminais, contendo espermatozoides, removidas, isoladas e transferidas para solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida as vesículas foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após a lavagem no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, seguiu-se a desidratação em acetona 50% e 70%. Neste ponto, o material foi colocado em solução de uranila a 2% em acetona 70% por 24 horas, posteriormente em acetona 90% e 100%, seguida de infiltração e inclusão na resina epoxi Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo 1% seguindo-se observação em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 da Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC, FIOCRUZ.

4. RESULTADOS

4.1 Comportamento de cópula

Foram observados 23 casais de *T. rubrovaria*. Destes, somente seis oriundos de Lavras do Sul realizaram a cópula. Os cruzamentos dos espécimes das localidades Caçapava do Sul + Encruzilhada do Sul; Caçapava do Sul + Canguçu e Canguçu + Encruzilhada do Sul não copularam.

Os casais foram colocados na arena copulatória, e imediatamente, um tempo de 20 minutos era cronometrado e o comportamento observado. Podemos ver que os casais começavam a se aproximar, usando as antenas para tatear o parceiro, tempo que chamamos de “reconhecimento” e levava cerca de três minutos. Se após este tempo não houvesse o reconhecimento, a cópula não ocorria. Esperava-se concluir os 20 minutos, para então, separar os casais.

Nos casais em que houve a aproximação e reconhecimento, a cópula ocorria entre seis a oito minutos após a junção do casal na arena copulatória. Quando a fêmea estava receptiva, ela erguia a parte posterior de seu corpo permitindo que o macho a segurasse com suas pernas posteriores e se posicionasse lateralmente para a devida aproximação das genitálias e execução da cópula. Em *T. rubrovaria*, o tempo de cópula variou entre 3-5 minutos.

Foram feitas medições de temperatura e umidade. E foi observado que os seis casais que copularam estavam sob temperatura de 25°C e UR 30%. Estes casais foram separados da mesma localidade (Lavras do Sul) ; casais formados a partir de localidades diferentes não copularam.

Cinco minutos após a cópula, as fêmeas foram dissecadas para observação da presença do espermatóforo no interior da bolsa copulatória. Das seis fêmeas, o espermatóforo foi visto em cinco.

4.2 Morfometria dos espermatozoides

Os espermatozoides das quatro espécies estudadas são finos e longos (Fig. 10).

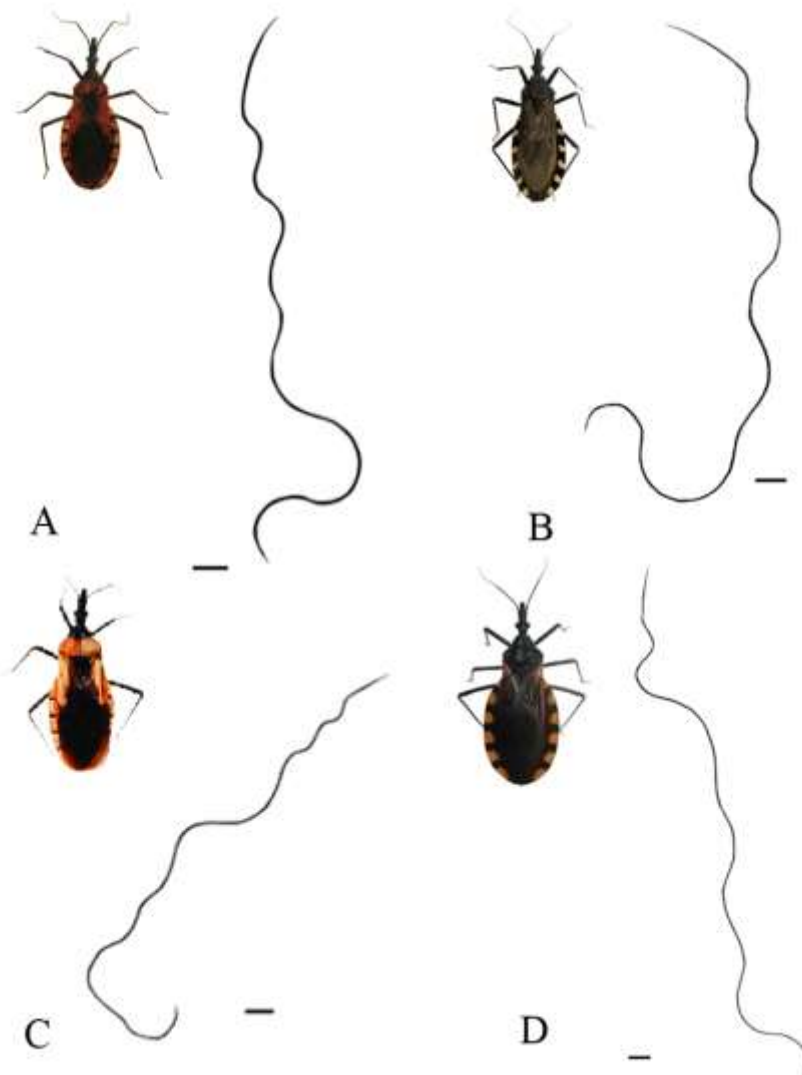


Figura 10: Esquema dos espermatozoides. A: *Triatoma carcavalloi*, B: *Triatoma infestans*, C: *Triatoma pintodiasi*, D: *Triatoma rubrovaria* (barra 10 μ m). Fotos dos triatomíneos: A (Santos-Mallet et al., 2008), B e C (Catarina Macedo); C (Jurberg et al., 2013).

4.3 Análises estatísticas

► **Primeira etapa:** a morfometria dos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* foi baseada em medidas de 100 espermatozoides de cada macho, totalizando 500 espermatozoides de cada espécie.

As medidas tiveram padrões assimétricos, sendo encontradas medidas mínimas de 400µm e máximas de 1000µm. A média total de todas as espécies reunidas foi de 550µm (tabela 1, gráfico 1).

Tabela 1: Comprimento médio (µm) dos espermatozoides dos três táxons do subcomplexo *Triatoma rubrovaria*.

Espécie	Média	Mediana	sd	Se
<i>T. carcavalloi</i>	482	453	73.69	3.295
<i>T. pintodiasi</i>	522.7	486	95.79	4.79
<i>T. rubrovaria</i>	598.3	531.4	130.5	5.835

sd: desvio padrão, se: erro padrão.

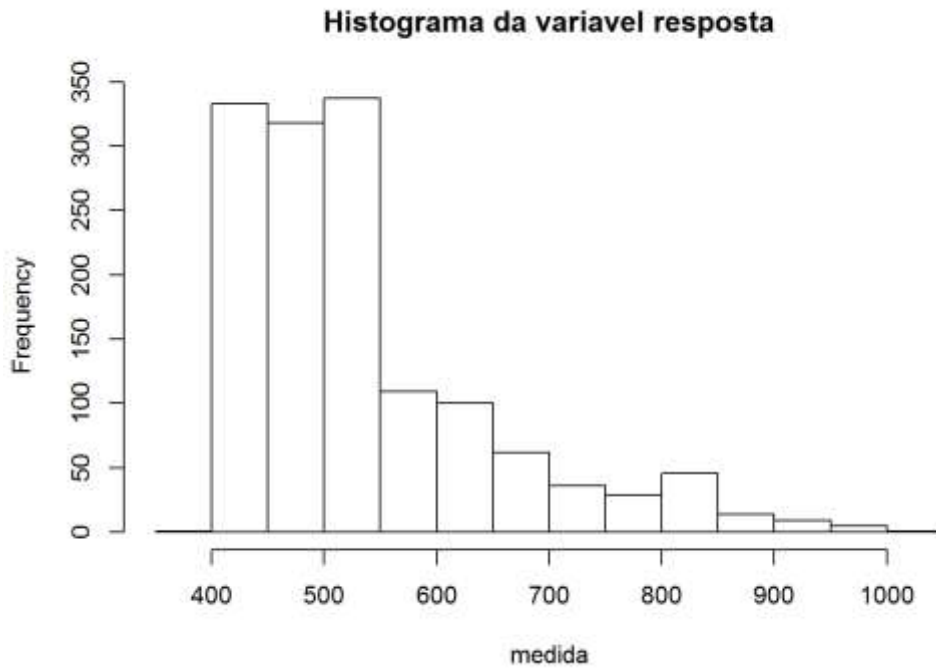


Gráfico 1: Média total das frequências de medidas dos espermatozoides das três espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria*.

Não foi encontrada diferença significativa entre os espermatozoides de cada espécie. Já que mais de 50% dos dados estão dentro das média de cada espécie analisada (Fig. 11). Se comparadas as três espécies juntas, os padrões dos tamanhos foram mantidos, porém, *T. carcavalloi* ainda teve menos variações em relação a *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

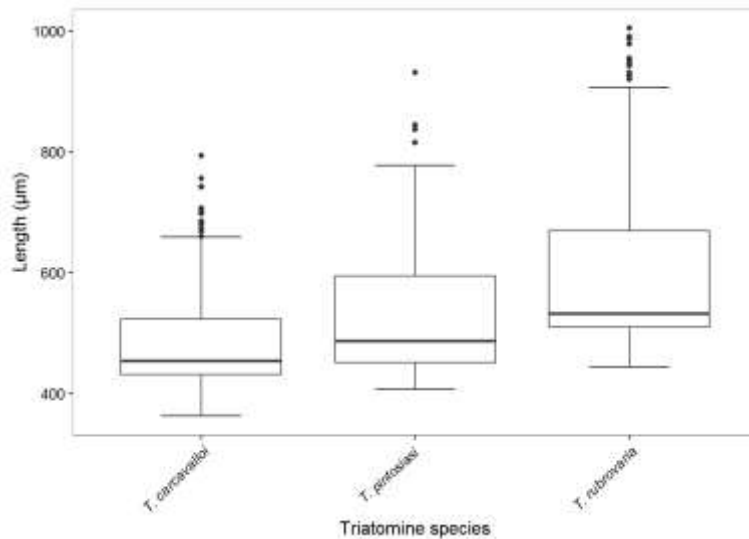


Figura 11: Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides dos três táxons do subcomplexo *Triatoma rubrovaria*

Quando analisados cada macho de cada espécie, não foram encontradas diferenças significativas. As medidas fora dos padrões foram poucas, não sendo significativas em relação ao padrão. Somente *T. rubrovaria* apresentou sensível variabilidade, principalmente, entre os machos 1 e 5 (Fig. 12).

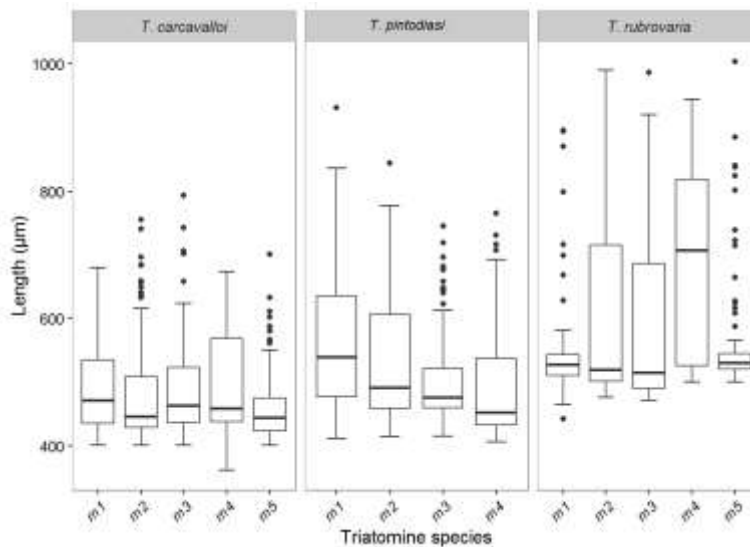


Figura 12: Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de cada macho dos três táxons do subcomplexo *Triatoma rubrovaria*

► **Segunda etapa:** diante dos resultados observados na primeira etapa, no qual os machos 1 e 5 de *T. rubrovaria* apresentaram diferenças significativas, a espécie *T. infestans* foi incluída nas análises, pois esta faz parte do complexo *T. infestans* e morfologicamente próxima às espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*. Assim como para as espécies do subcomplexo “*T. rubrovaria*”, foram medidos 100 espermatozoides de cada macho de *T. infestans*, totalizando 500 espermatozoides.

As análises estatísticas foram refeitas, e os padrões caracterizaram dois tipos de espermatozoides para cada espécie: curtos e longos. O teste estatístico K-means classificou 1358 como curtos e 408 como longos, e os outros 634 intermediários entre eles.

Analisando as medidas de cada espécie separadamente, as médias foram diferentes entre as quatro espécies estudadas: Em *T. carcavalloii*, o teste estatístico mostrou que a média total dos espermatozoides é de 482,99 μ m. A partir desta média o programa K-means estabeleceu um ponto de separação das medidas de 516,27 μ m, no qual os espermatozoides curtos apresentam uma média de 444,2 μ m e os longos 590,6 μ m (Tabela 2, Fig. 13). Em *T. infestans* a média total dos espermatozoides é de 571,76 μ m. O ponto de separação estabelecido pelo programa é de 642,01 μ m, os espermatozoides curtos apresentam uma média de 534,4 μ m e os longos 752,6 μ m (Tabela 3, Fig. 14). Em *T. pintodiasi* a média total dos espermatozoides é de 522,26 μ m. O ponto de separação estabelecido pelo programa é de 556,32 μ m, os espermatozoides curtos apresentam uma média de 466,9 μ m e os longos 649,8 μ m (Tabela 4, Fig. 15). Em *T. rubrovaria* a média total dos espermatozoides é de 598,15 μ m. O ponto de separação estabelecido pelo programa é de 664,63 μ m, os espermatozoides curtos apresentam uma média de 528,9 μ m e os longos 805,1 μ m (Tabela 5, Fig. 16).

Tabela 2: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de *T. carcavalloi*

Tipo de sptz	N	Média	Sd	Min.	Máx.	se
Curtos	371	444,2	27,15	361,4	516,3	1,41
Longos	129	590,6	54,68	517,7	793,3	4,83

N: número de sptz; **sd:** desvio padrão; **min:** tamanho mínimo do sptz; **máx:** tamanho máximo do sptz; **se:** erro padrão

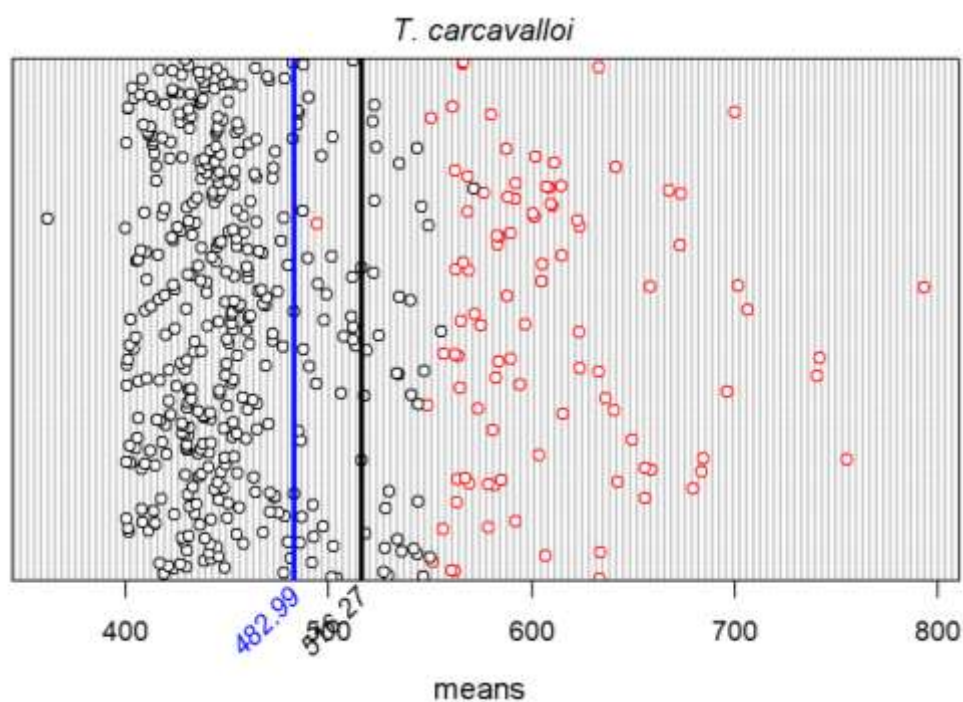


Figura 13: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de *T. carcavalloi*.

Tabela 3: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de *T. infestans*

Tipo de sptz	N	Média	sd	Min.	Máx.	se
Curtos	428	534.4	44.41	402.4	642	2.15
Longos	71	752.6	63.87	654.6	921	7.58

N: número de sptz; **sd:** desvio padrão; **min:** tamanho mínimo do sptz; **máx:** tamanho máximo do sptz; **se:** erro padrão

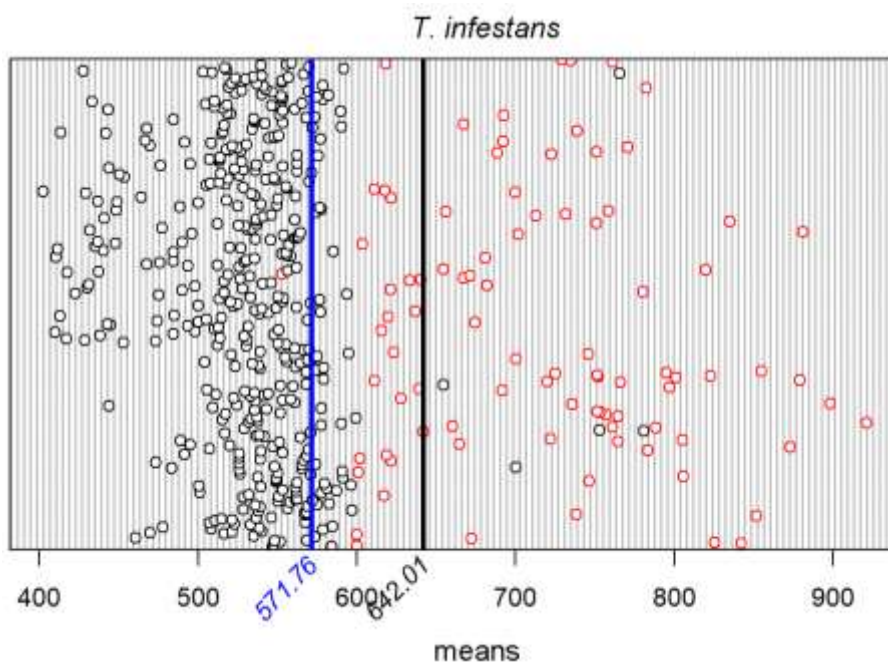


Figura 14: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de *T. infestans*.

Tabela 4: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de *T. pintodiasi*

Tipo de sptz	N	Média	sd	Min.	Máx.	se
Curtos	278	466,9	34,84	406,3	556,3	2,09
Longos	122	649,8	63,58	559	931,1	5,76

N: número de sptz; **sd:** desvio padrão; **min:** tamanho mínimo do sptz; **máx:** tamanho máximo do sptz; **se:** erro padrão

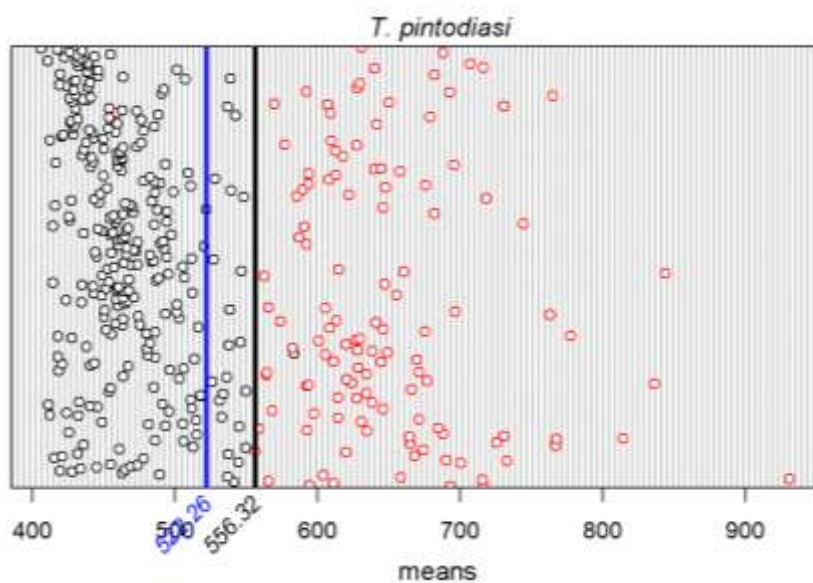


Figura 15: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de *T. pintodiasi*.

Tabela 5: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides de *T. rubrovaria*

Tipo de sptz	N	Média	sd	Min.	Máx.	se
Curtos	374	528,9	40,62	442,6	664,6	2,11
Longos	126	805,1	75,74	668,1	1004	6,75

N: número de sptz; **sd:** desvio padrão; **min:** tamanho mínimo do sptz; **máx:** tamanho máximo do sptz; **se:** erro padrão

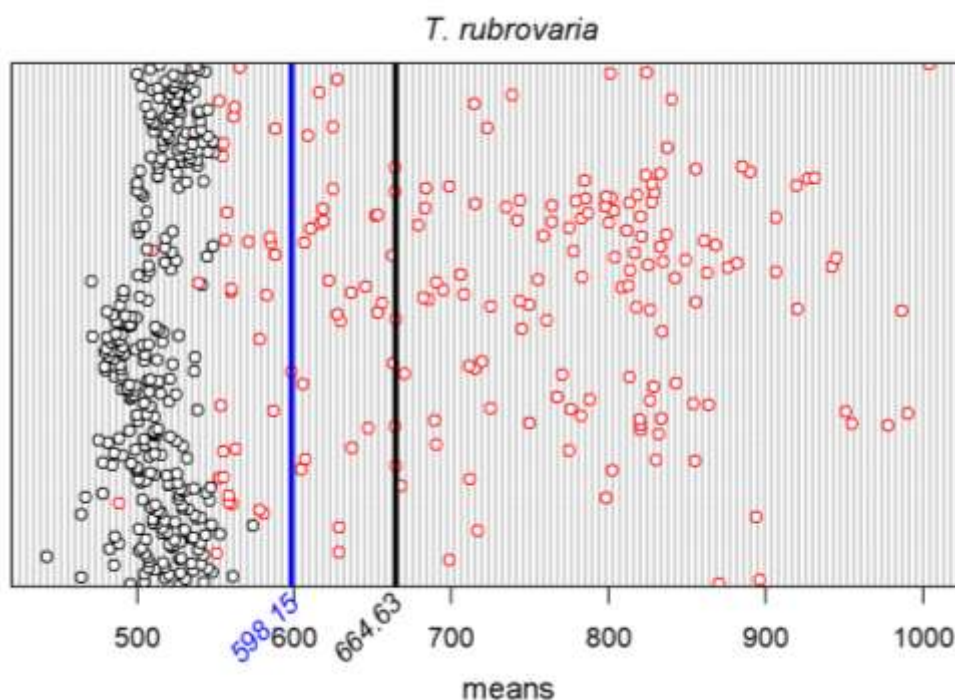


Figura 16: Médias dos comprimentos (μm) dos espermatozoides de *T. rubrovaria*

Quando comparadas as quatro espécies, para a grande maioria dos casos, é possível separá-las de acordo com o comprimento dos espermatozoides, sejam eles curtos ou longos. No entanto, *T. infestans* e *T. rubrovaria*, não apresentaram diferença significativa quanto ao comprimento de espermatozoides longos, pois os intervalos se sobrepõem (Fig. 17).

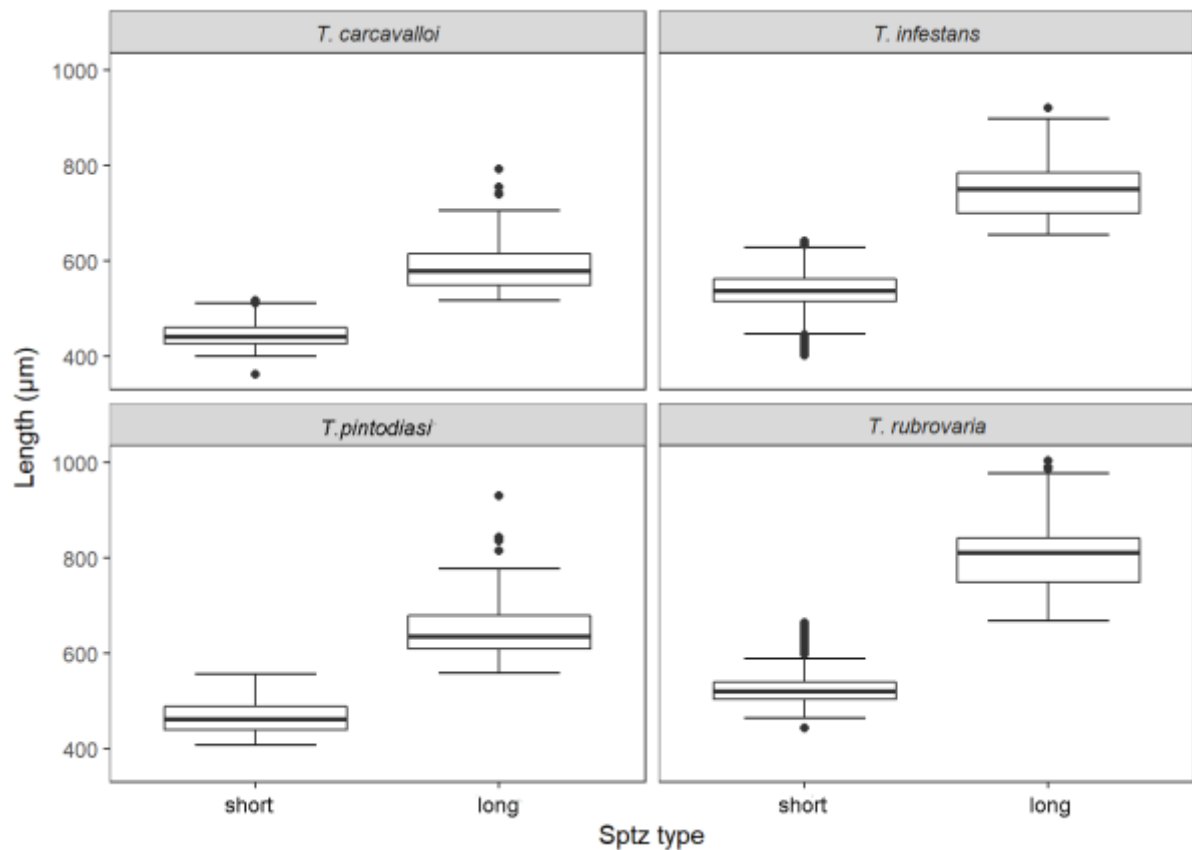


Figura 17: Boxplots exploratórios das medidas das quatro espécies, de acordo com a classificação via K-means.

4.4 Morfologia estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides

Os espermatozoides das quatro espécies apresentam morfologia ultraestrutural semelhantes, formados pelo núcleo, inserido na extremidade anterior, e o flagelo, composto pelo fio axial duplo e dois derivados mitocondriais (Fig.18). O núcleo é linear, longo e preenchido por cromatina condensada homogênea, que em corte transversal tem aparência circular (Fig. 18). O núcleo é mais estreito na região apical do espermatozoide e se torna largo à medida que se aproxima do adjunto do centríolo. Na

transição entre núcleo e flagelo, pode ser visto o adjunto do centríolo, paralelo ao núcleo (Fig. 19).

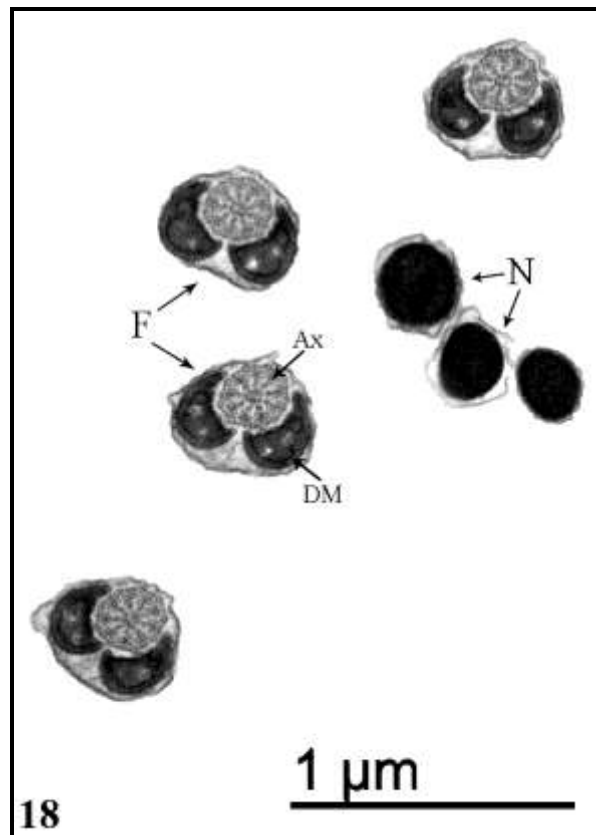


Figura 18: Electromicrografia dos espermatozoides de *T. carcaivalloi* em corte transversal. N: núcleo, F: flagelo, Ax: filamento axial, DM: derivados mitocondriais.

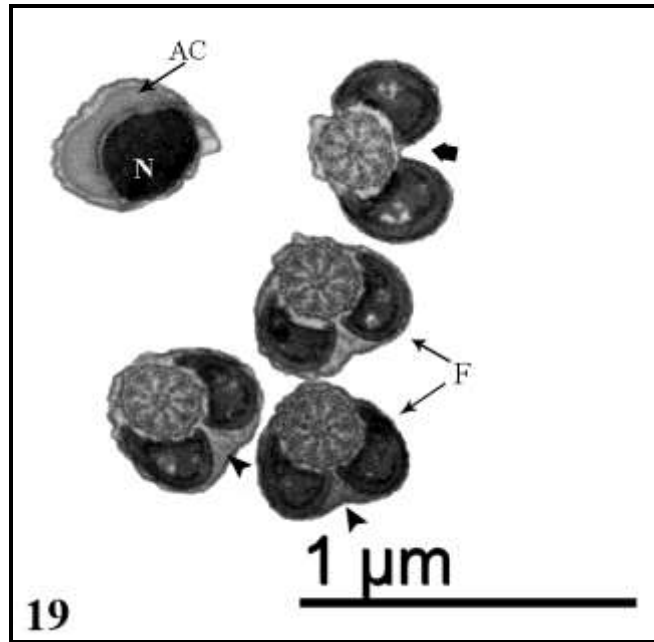


Figura 19: Electromicrografia dos espermatozoides de *T.carcavalloi* em corte transversal. N: núcleo, F: flagelo, AC: adjunto do centríolo. Área eletrodensa (cabeça de seta). Região do flagelo sem conexão do centríolo (seta).

Na transição entre núcleo e flagelo, após o adjunto do centríolo, os derivados mitocondriais começam a surgir. Os derivados mitocondriais se mantêm mais próximos entre si por uma área eletrondensa, que parece ser o final do adjunto do centríolo, e, à medida que se segue o flagelo, estes começam a se afastar e não se conectam mais (Fig. 19).

A conexão dos derivados mitocondriais com o axonema é feita por meio de pontes aderidas a cisternas entre os derivados mitocondriais e os microtúbulos, e o formato geral do flagelo (derivados mitocondriais+axonema), em corte transversal, e cordiforme (Fig. 20). O axonema do flagelo segue o padrão de arranjo microtubular $9 + 9 + 2$ (9 microtúbulos acessórios periféricos, 9 microtúbulos duplos em uma posição intermediária e 2 microtúbulos centrais); e dois derivados mitocondriais de mesmo tamanho (Fig. 20).

Cada derivado mitocondrial (DM) apresenta três regiões distintas: dois corpos cristalinos elétron-lucentes (1), circundadas pela área de material cristalino elétron-denso (2) e uma área cristalina periférica (Fig. 20).

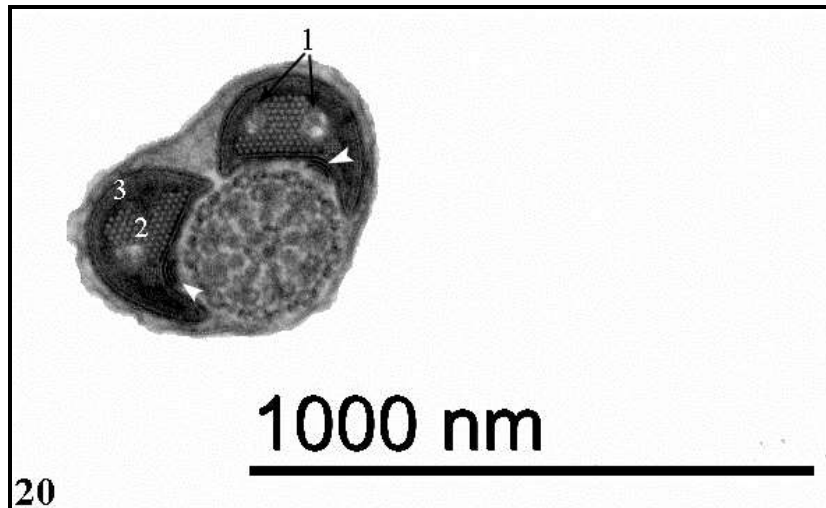


Figura 20: Electromicrografia do flagelo do espermatozoide de *T.rubrovaria* em corte transversal. Em destaque o axonema e as três regiões dos derivados mitocondriais (DM): duas áreas electrodensas (1), área de material cristalino (2) e área cristalina periférica (3). Pontes entre os microtúbulos e os derivados mitocondriais (cabeça de seta).

5. DISCUSSÃO

Embora o comportamento reprodutivo em um número de espécies de Triatominae tenha sido estudado (Rojas, 1990; Rojas & Lopez, 1992; Pires et al., 2004; Vitta & Lorenzo, 2009; Pereira-Lourenço et al., 2013), alguns aspectos ainda são pouco esclarecidos, como produção e transferência do espermatóforo; e o tempo de cópula interespecífico.

A corte, denominada “dança do amor”, foi descrita nos estudos de comportamento de cópula de triatomíneos como sendo importante para o sucesso reprodutivo do macho (Hase, 1962 apud Rojas, 1990; Lima, 1986). Pereira-Lourenço et al. (2013) pontuara que em *T. infestans* e *R. neglectus* esse comportamento foi pouco observado, provavelmente devido ao fato dessas espécies terem sido obtidas de colônias mantidas em laboratório, sugerindo que esse processo pode estar relacionado a sua biologia evolutiva, em que espécies com alto grau de adaptação a ambientes fechados podem mostrar um comportamento sexual menos estereotipado (Schofield, 1988).

O comportamento de cópula nos triatomíneos é o mesmo em todos os estudos realizados. Porém, o tempo de cópula varia entre as espécies, sendo de 10 a 16 minutos em *Triatoma* (Rojas, 1990, Rojas & Lopez, 1992; Vitta & Lorenzo, 2009; Pereira-Lourenço et al., 2013), e *Rhodnius neglectus* com um tempo de 30 a 50 minutos (Pereira-Lourenço et al., 2013). No presente estudo, *T. rubrovaria*, apresenta tempo de cópula de 3-5 minutos, bem abaixo das demais espécies de *Triatoma* estudadas.

No presente estudo, 23 casais de *T. rubrovaria* foram observados para descrever o comportamento de cópula. Destes, somente seis realizaram a cópula, com a fêmea receptiva erguendo a parte posterior de seu corpo, permitindo que o macho a segurasse

com suas pernas posteriores e se posicionasse lateralmente, aproximando as genitálias, além da presença do espermátforo dentro da bolsa copulatória da fêmea.

Estudos com *T. brasiliensis macromelasoma* e *T. juazeirensis* feitos por Costa et al. (2003) mostraram que estas espécies habitam ecótopos similares, e a probabilidade de encontro entre elas, é o que aumenta a possibilidade de ocorrência de cópula e híbridos naturais. Em *T. rubrovaria*, os seis casais que copularam estavam sob as mesmas condições de temperatura e eram oriundos de Lavras do Sul, todos coletados em rochas. No entanto, em condições de laboratório, os casais formados a partir de espécimes de diferentes localidades não copularam, sugerindo que as condições ambientais das diferentes localidades podem influenciar diretamente na cópula de *T. rubrovaria*.

Os triatomíneos tornam-se aptos para a reprodução após a muda imaginal (Dumser & Davey, 1974; Schofield & Upton, 1978; Rossiter & Staddon, 1983). Alguns fatores como a idade e o estado nutricional são essenciais para que ocorra a cópula nestes insetos (Lima et al. 1986, Malo et al. 1993, Manrique and Lazzari 1994, Pires et al. 2004). Os insetos utilizados no presente estudo eram todos virgens e foram alimentados 15 dias antes dos cruzamentos, ou seja, com condições fisiológicas semelhantes. Durante as observações do acasalamento de *T. rubrovaria*, algumas fêmeas, quando individualizadas com um certo macho, não aceitavam a cópula, embora o macho estivesse cortejando e tentando copular. Sendo que dos cinco casais que copularam, em três, aconteceu a cópula quando os machos foram trocados.

Em *T. brasiliensis*, a duração do acasalamento foi prolongada na presença de outros machos em comparação com observações de pares isolados, e os machos desta espécie realizaram associações pós-copulatórias longas apenas na presença de outros

machos, aparentemente como uma resposta guardadora da presença de potenciais competidores (Vitta e Lorenzo, 2009).

Rocha (2012), em sua tese, ressaltou o posicionamento de *T. rubrovaria* como espécie estreitamente relacionada à *T. circummaculata*, mas enfatizou a necessidade da associação de novas tecnologias para definição e agrupamento dessas espécies. Almeida et al. (2002) levantaram a hipótese de existirem duas populações distintas de *T. rubrovaria*, uma com indivíduos apresentando distintos padrões cromáticos e geneticamente similares e outra, proveniente de Canguçu, geneticamente isolada e de morfologia distinta. Portanto, no caso de *T. rubrovaria*, a ausência de cópula pode ser ocasionada devido diferentes populações.

Em relação aos espermatozoides, a produção de mais de um tipo de espermatozoide já foi registrada para outros Hemiptera, como nas famílias Pentatomidae (Araújo et al., 2011), Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006) e Largidae (Araújo et al., 2012).

No presente estudo foram observados dois tipos de espermatozoides nas três espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* e no *T. infestans*, caracterizando o dimorfismo espermático para este grupo. Corroborando com Baffa et al. (2017), que descrevem dois tipos de espermatozoides, curtos e longos, para cinco espécies do complexo *Triatoma brasiliensis*.

O comprimento total dos espermatozoides das quatro espécies estudadas foram menores que os anteriormente descritos em Hemiptera (Báo & De Souza, 1994; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006; Araújo et al., 2010, 2011, 2012; Baffa et al., 2017). Em relação aos Triatominae, Báo & De Souza (1994) citam o tamanho do *Rhodnius prolixus* como sendo de aproximadamente 350µm, e não é feita nenhuma referência à presença de mais de uma classe de comprimento dos espermatozoides dessa

espécie, corroborando com os resultados da primeira etapa desse trabalho, em que o tamanho médio dos espermatozoides foi de 550µm.

De acordo com a análise estatística realizada na segunda etapa, os espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* apresentam diferença significativa, assim como encontrado em *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki*, táxons do complexo *T. brasiliensis*, estudados por Baffa et al. (2017).

Um fenômeno comum nos insetos é a organização dos espermatozoides em feixes nas vesículas seminais (Kubo-Irie et al., 2003; Lino-Neto et al., 2008) e, na maioria das vezes, estes são transferidos assim para as fêmeas durante a cópula. No caso dos Hemiptera, esse fenômeno foi observado em Auchenorrhyncha (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006; Araújo et al., 2010). Entretanto, essa condição não foi vista em Largidae (Heteroptera) (Araújo et al., 2012), nos membros do complexo “brasiliensis” (Baffa et al. 2017), e nas quatro espécies aqui estudadas, o que sugere que em Heteroptera os espermatozoides são mantidos individualizados nas vesículas seminais.

Os espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* são longos e filiformes, compostos pela cabeça e flagelo, característica comum entre os insetos. Exceções a esse padrão já foram observadas em: Ephemeroptera, em que três espécies de Leptophlebiidae apresentaram espermatozoides muito pequenos, de até 2µm, aflagelados e imóveis (Gaino & Mazzini, 1991); Hemiptera, em que três espécies de Aleyrodidae também apresentaram espermatozoides aflagelados e imóveis (Báo et al., 1997); e Hymenoptera, em que os espermatozoides de duas espécies de Eulophidae são finos e longos, mas espiralados (Santos et al., 2013).

Em relação às estruturas dos espermatozoides, em *Aethalion reticulatum* Linnaeus, 1767 (Auchenorrhyncha: Aethalionidae) o núcleo tem formato oval na extremidade anterior e é preenchido por cromatina condensada com espaços elétron-lucentes, presentes em todo seu comprimento (Araújo et al., 2010). Em algumas espécies de Pentatomidae (Heteroptera) já estudadas, esses espaços elétron-lucentes também foram observados (Araújo et al., 2011). Diferindo destes, o núcleo dos três táxons aqui estudados é linear, tendo sua extremidade anterior mais afilada que a posterior, e é preenchido por cromatina condensada homogênea, não apresentando os espaços elétron-lucentes descritos acima.

O adjunto centriolar nos membros do subcomplexo “rubrovaria” é uma estrutura formada ao redor do centríolo na região de transição entre o núcleo e o flagelo, e segundo Chawanji et al. (2006) e Araújo et al. (2011), pode ter uma função mecânica, prendendo a cabeça e o flagelo juntos.

Em relação aos derivados mitocondriais, algumas espécies de Lepidoptera apresentam dois de tamanhos diferentes (Garvey et al., 2000; Mancini & Dolder, 2004). Em algumas famílias de Diptera (Sciariidae, Mycetophilidae, Ptychopteridae e Psychodidae) pode ser visto apenas um derivado mitocondrial, enquanto em outras (Drosophilidae, Syrphidae, Sepsidae e Muscidae) são observados dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes, e em Culicidae e Simuliidae, os dois têm tamanhos semelhantes, (Phillips, 1970; Dallai & Afzelius, 1991, Fausto et al., 1995).

Os dois derivados mitocondriais dos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* são de mesmo tamanho, conforme já foi observado em outros Heteroptera, como *L. rufipennis* (Araújo et al., 2012), *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1794), *Piezodorus guildini* (Westwood, 1837), *Thyanta perditor* (Fabricius, 1794) (Fernande & Báó, 2001), *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Báó

& De Souza, 1994), *Raphigaster nebulosa* (Poda, 1761), *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy, 1785) e *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Mercati *et al.* 2009), além dos Auchenorrhyncha, *Monomatapa matoposa* Boulard, 1980, *Diceroprocta biconica* (Walker, 1850) , *Kongota punctigera* (Walker, 1850) (Chawanji *et al.*, 2007) e complexo *Triatoma brasiliensis* (Baffa *et al.* 2017).

O arranjo microtubular do axonema dos espermatozoides aqui estudados segue o padrão de 9+9+2, o mais comum encontrado entre os insetos, porém variações no número de elementos centrais podem ser vistas em algumas ordens. Os exemplos mais impressionantes são: a substituição do par central de microtúbulos por sete microtúbulos centrais arranjados simetricamente em duas espécies de Trichoptera (Phillips, 1970); um único microtúbulo central, apresentando padrão microtubular 9+9+1, como sendo característico de espécies de mosquito (Breland *et al.*, 1966, 1968); e um padrão microtubular 9+9+0 observado no espermatozoide de Psychodidae (Diptera) (Fausto *et al.*, 1995).

O espermatozoide de Heteroptera tem certas características que não são encontradas em outros insetos e consideradas sinapomorfias dentro da subordem: dois ou três corpos cristalinos dentro dos derivados mitocondriais e pontes aderidas a cisternas, conectando os derivados mitocondriais aos microtúbulos do axonema. Essas características foram encontradas em Pentatomidae (Fernandes & Báó, 2001; Mercati *et al.*, 2009), em Pentatomidae, Plataspididae e Pyrrhocoridae (Mercati *et al.*, 2009), em Hydrometridae, Corixidae, Nepidae, Coreidae, Pyrrhocoridae, Lygaeidae, Reduviidae e Cimicidae (Dallai & Afazelius, 1980) e em Reduviidae (Báó & De Souza, 1994; Dolder, 1988; Baffa *et al.*, 2017). No presente estudo essas características foram observadas nas quatro espécies estudadas, corroborando a hipótese da sinapomorfia, indicando ser este um caráter útil em estudos filogenéticos.

6. CONCLUSÕES

- Em *T. rubrovaria* o tempo de cópula é de 3-5 minutos, tempo suficiente para transferir o espermátóforo para a fêmea;
- Os espermatozoides das quatro espécies estudadas apresentam dimorfismo espermático, com média de 493,6 para curtos, e média de 699,5 para longos;
- A morfologia ultraestrutural dos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans* e *T. rubrovaria* são semelhantes;
- Dois corpos cristalinos no interior de cada derivado mitocondrial e as pontes aderidas a cisternas entre os derivados mitocondriais e os microtúbulos são identificados nos espermatozoides de *T. carcavalloi*, *T. infestans* e *T. rubrovaria*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZELIUS, B.A.; DALLAI, R.; LINDSKOG, P.; Spermatozoa of Saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). J. Ultrastr. Res. 90: 304-312. 1985.

ALMEIDA, C. E., MARCET, P.L., GUMIEL. M., TAKIYA, D. M., CARDOZO-DE-ALMEIDA, M. A. R., PACHECO, R.S., LOPES, C.M., DOTSON, E.M., 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, C.E., PACHECO, R.S., HAAG, K., DUPAS, S., DOTSON, E.M., 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, C.E., FOLLY-RAMOS, E., AGAPITO-SOUZA, R., MAGNO-ESPERANÇA, G., PACHECO R. S., COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera- Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100: 231-235. 2005.

ALMEIDA, C. E., FRANCISCHETTI, C.N., PACHECO, R. S., COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98: 367-371. 2003.

ALMEIDA, C.E., DUARTE, R., PACHECO, R.S., 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, 97: 1127-1131. 2002a.

ALMEIDA, C. E., PACHECO, R.S., 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, 97: 829-834. 2002b.

ALMEIDA, C. E., VINHAES, M. C., ALMEIDA, J. R., SILVEIRA, A. C., 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, 95: 761-768. 2000.

ARAÚJO, V.A., BÁO, S.N., LINO-NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). Acta Zoologica 93: 239-244. 2012.

ARAÚJO, V.A., LINO-NETO, J., RAMALHO, F.S., ZANUNCIO, J.C., SERRÃO, J.E. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Hemiptera: Heteroptera). Micron 42: 560-567. 2011.

- ARAÚJO, V.A.; BÁO, S.N.; MOREIRA, J.; NEVES, C.A.; LINO-NETO, J. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). *Micron* 41 (4): 306–311. 2010.
- BAFFA, A. F.; CAMARA, D. C. P. SANTOS-MALLET, J. R.; DA SILVA, E. R.; COSTA, J.; FREITAS, S. P. C.. Sperm dimorphism in the *Triatoma brasiliensis* species complex and its applications. *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/mve.12226. 2017.
- BÁO, S. N.; KITAJIMA, E. W.; CALLAINI, G.; LUPETTI, P.; DALLAI, R. Spermiogenesis in three species of whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). *Acta Zool.* 78(2): 163-170. 1997.
- BÁO, S. N. & DE SOUZA, W., Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue & Cell* 26 (3): 299–308. 1994.
- BAR, M. E.; MILANO, .A. M. F.; DAMBORSKY, M. P.; OSCHEROV, E. B.; AVALOS, G. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. *Rev Soc Entomol Argentina.*; 63: 107-113. 2003.
- BARATA, J. M. S. 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.
- BARRETO, M. P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do Trypanossoma cruzi, com especial referencia no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 10: 339-353. 1976.
- BARROZO, R. B.; LAZZARI, C. R. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses* 29:319-329. 2004a.
- BARROZO, R. B.; LAZZARI, C. R. Orientation behaviour of the bloodsucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses* 29:833-841. 2004b.
- BARROZO, R. B., SCHILMAN, P. E., MINOLI, S., LAZZARI, C. R. Daily rhythms in disease-vector insects. *Biological Rhythm Research* 35: 79-92. 2004.
- BARROZO, R. B., MINOLI, S.A., LAZZARI, C. R. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Insect Physiol.* 50:249-254. 2004.
- BARROZO, R. B., MANRIQUE, G., LAZZARI, C. R. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemipetra: Reduviidae). *J Insect Physiol* 49:315-321. 2003.

- BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 56 (1): 209-238. 1958.
- BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). III parte: Pesquisas sobre o mecanismo da picada dos Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 51, p. 11-68, 1953.
- BARUFFA, G. A doença de Chagas no Rio Grande do Sul - Brasil. Vittalle 2: 9-18. 1986.
- BRELAND, O. P., EDDLEMAN, C. D., BIESELE, J. J. Studies of insect spermatozoa. I. Entomol. News. 79:197 . 1968.
- BRELAND, O.P.; GASSNER, G.; RIESS, R. W.; BIESELE, J. J. Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. Can. J. Genet. Cytol. 8: 759. 1966.
- CARTHY, J. D., & HOWSE, P. E. *Comportamento animal*. São Paulo: EPU / DUSP. 1980.
- CARCAVALLO, R. U., JURBERG, J., LENT, H., GALVÃO, C., STEINDEL, M., PINTO, C. J. C. “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.
- CARVALHO, R. S. E. F., VILELA, M., BORGES, & ZANUNCIO, J. C. Comportamento de acasalamento do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas), em laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 24, 165-171. 1995.
- CARDOZO-DE-ALMEIDA, M., NEVES, S.C.T., DE ALMEIDA, C.E., DE LIMA, N.R.C., OLIVEIRA, M. L. R., SANTOS-MALLET, J. R. Biology of *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 under laboratory conditions. Rev Soc Bras Med Trop, 47(3): 307-312. 2014.
- CARDOZO-DE-ALMEIDA, M., CASTRO-DE-SOUZA, S., OLIVEIRA, M. L. R., ALMEIDA, S. A. S., GONÇALVES, T. C. M., SANTOS-MALLET, J. R. Ultrastructure and morphometry of eggs of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavallo* Juberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). Zootaxa, 3750 (4): 348-356. 2013.
- CARDOZO-DE-ALMEIDA, M.A.R. Aspectos morfológicos, Filogenéticos, Morfométricos e Biológicos de espécies do subcomplexo “rubrovaria” (HEMIPTERA:REDUVIIDAE:TRIATOMINAE). Tese de Doutorado. 139pp. 2012.
- CARDÉ, R. T., MINKS, A. K. Insect pheromone research: new directions. Chapman & Hall, New York, pp 684. 1997.

- CARDÉ, R. T., BELL, W. J. Chemical ecology of insects 2. Chapman & Hall, New York, pp 443. 1995.
- CHAPMAN, R. F. Male reproductive system. In: *The Insects: Structure and Function*. 4th ed. India: Cambridge University Press. pp. 268-294. 1998.
- CHAPMAN, R. F. *The insects: Structure and function* (3rd ed.). London: Holder and Stoughton. 1982.
- CHAWANJI, A. S., HODGSON, A. N., VILLET, M. H., SANBORNAND, A. F., PHILLIPS, P. K. Spermogenesis in three species of cicadas (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Zool.* 88: 337–348. 2007.
- CHAWANJI, A. S., HODGSON, A. N., VILLET, M. H. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue & Cell* 38: 373-388. 2006.
- CHAWANJI, A. S., HODGSON, A. N., VILLET, M.H. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue & Cell* 37: 257-267. 2005.
- COOK, P. A. & WEDELL, N. Non-fertile sperm delay female remating. *Nature* 397:486. 1999.
- COSTA, J., ALMEIDA, C. E., DUJARDIN, J. P., BEARD, C. B. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; 98: 637-639. 2003.
- COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 108(8): 962-967. 2013.
- COURA, J. R., ALBAJAR-VIÑAS, P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465 (Supl.): S6-S7. 2010.
- COURA, J. R., DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. D): 31-40. 2009.
- COURA, J. R., ARBOLEDA, M. N., WILLCOX, H. P. F. Doença de Chagas na Amazônia brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop* 26 (Suppl. 2): 15-17. 1993.
- CUNHA, W. H. A. O estudo etológico do comportamento animal. *Ciência Cultural*, 27 (3), 262-268. 1974.
- CURTO DE CASAS, S. I., CARCAVALLO, R. U., GALINDEZ-GIRÓN, I., BURGOS, J. J. Factores bioclimáticos e zonas de vida. In: Carcavallo RU, Galindez-Girón I, Jurberg J, Lent H, editores. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Vol. 3. Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 793-838. 1999.

- DALLAI, R. & AFZELIUS, B. A. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophilidae) (Diptera). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 20: 215-222. 1991.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B. A. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *J. Morphol.* 164: 301-309. 1980.
- DANILOVA, L. V., GABER, E. S., SHINYAEVA, L.I., Spermiogenesis and the ultrastructure of mature sperm in *Eurygaster intergriceps*. *Gamete Res.* 9: 75–86. 1984.
- DIAS, J. C. P. Doenças de Chagas: sucessos e desafios. *Cad Saude Publica*; 22: 2020-2021. 2006.
- DIAS, J.C.P., SILVEIRA, A.C., SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease in Latin America – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97 (5): 603-612. 2002.
- DOLDER, H. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Ultrast Res. Mol. Stru. Res.* 101(2-3): 159-164. 1988.
- DORN, P. L., JUSTI, S. A., DALE, C., STEVENS, L., GALVÃO, C., LIMA-CORDÓN, R., MONROY, C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys* 775: 60-95. 2018.
- EBERHARD, W. G. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp.501. 1996.
- EBERHARD, W. G. Copulatory courtship and cryptic female choice in insects. *Biol. Rev.*, 66, 1-31. Printed in Great Britain. 1991.
- FAUSTO, A.M., MAZZINI, M., MAROLI, M., FELICIANGELI, D. Spermatozoon of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) (Diptera, Psychodidae). *Boll. Zool.* 62: 339-343. 1995.
- FREITAS, S.P.C., GONÇALVES, T.C.M., SERRÃO, J. E., COSTA, J., SANTOS-MALLET, J. R., Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron* 41:518-525. 2010.
- FRÍAS – LASSERRE, D. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. *Neotrop Entomol* 39(1): 572-583. 2010.
- GAINO, E. & MAZZINI, M. Aflagellate sperm in three species of Leptophlebiidae (Ephemeroptera). In. *J. Insect Morphol. & Embryol.* 20(3): 119-125. 1991.
- GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba, Sociedade Brasileira de Zoologia. 2015.

GALVÃO, C. A Sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol y Vect*, v. 10, n. 4, p. 511-530. 2003.

GARVEY, L. K., GUTIERREZ, G. M., KRIDER, H. M. Ultrastructure and morphogenesis of the apyrene and eupyrene spermatozoa in the gipsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* 93(5): 1147-1155. 2000.

GONÇALVES, T. C. M., TEVES-NEVES, S. C, SANTOS-MALLET, J. R., CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L., LOPES, C. M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 429-437. 2013.

GROOT, A. T . Sexual behaviour of the green capsid bug. PhD thesis, University of Wageningen: 11-150. 2000.

GURGEL-GONÇALVES, R., GALVÃO, C., COSTA, J., PETERSON, A. T. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. *J Trop Med*: 1-15. 2012.

GULLAN, P. J., & CRANSTON, P. S. *The insects, na outline of entomology*. London: Chapman & Hall. 1994.

GÜRTLER, R. E. Control campaigns against *Triatoma infestans* in a rural community of northwestern Argentina. *Medicina*. 59: 47-54. 1999.

HERNÁNDEZ, M. L., DUJARDIN, J. P., GORLA, D. E., CATALÁ, S. S. Potential sources of *Triatoma infestans* reinfesting peridomiciles identified by morphological characterization in Los Llanos, La Rioja, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108: 91-97. 2013.

JAMIESON, B. G. M. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insects Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 320. 1987.

JURBERG, J., CUNHA, V., CAILLEAUX, S., RAIGORODSCHI, R., LIMA, M.S., ROCHA, D.S., MOREIRA, F. F. F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo T. rubrovaria (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Pan-Amaz Saude*, 4(1):43-56, 2013.

JURBERG, J. Ferramentas usadas em Taxonomia de Triatomíneos, o uso múltiplo. *Entomol y Vect*, v. 10, p. 497-509. 2003.

JUSTI, S.A. & GALVÃO, C. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends Parasitol.* Jan;33(1):42-52. doi: 10.1016/j.pt.2016.11.002. Epub 2016 Dec 13. 2017.

KÄLIN, M. & BARRETT, F. M. Observations on the anatomy, hystology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68:126-134. 1975.

- KLOWDEN, M. J. *Physiological Systems in Insects*. 2ª ed. Academic Press. p. 210. 2007.
- KUBO-IRIE, M., IRIE, M., NAKAZAWA, T., MOHRI, H. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *J. Insect Physiol.* 49: 983-991. 2003.
- 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.
- LEE, Y. H. Spermatogenesis of the water strider *Gerris paludum* (Heteroptera, Gerridae). *J. Ultrastr. Res.* 90: 235-250. 1985.
- LIMA, M. M., JURBERG, P., ALMEIDA, J. R. Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus*. (Burm 1835) in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 1-5. 1986.
- LINO-NETO, J., DOLDER, H., MANCINI, K., MERCATI, D., DALLAI, R. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: Symphyta). *Tissue & Cell* 40: 185-193. 2008.
- LOROSA, E. S., SANTOS, C. M., JURBERG, J. Foco de doença de Chagas em São Fidélis, no estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(4): 419-420. 2008.
- MANCINI, K. & DOLDER, H., Dichotomic spermiogenesis in *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(1): 13-23. 2004.
- MAYR, E. *Populações, espécies e evolução*. São Paulo: Nacional / EDUSP. 1977.
- MANRIQUE, G., LAZZARI, C. R. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 629-633. 1994.
- MERCATI, D., GIUSTI, F., DALLAI, R. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). *J. Morphol.* 270: 825-833. 2009.
- MONTEIRO, F. A., 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.
- NASCIMENTO, C., MARASSÁ, A. M., CURADO, I., PIAZZA, R. M. F. Encontro de *Panstrongylus megistus* em ecótopo artificial: Domiciliação ou mera visitação. *Rev Soc Brasil Med Trop* 30: 333-336. 1997.
- 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, M. F., 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.

NÚÑEZ, J. Á. Behaviour of Triatominae bugs. In: Chagas` disease Vectors, vol II Anatomic and Physiological aspects (eds. Brenner RR, Stoka AM), pp 1-30, CRC Press. 1987.

NÚÑEZ, J. Á. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. Ent. Res.* 72: 252–262. 1982.

PAHO. Chagas Disease. 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=pt (Acessado: Fevereiro de 2017)

PARKER, G. A. Sperm Competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45: 525-567. 1970a.

PARKER, G. A. The reproductive behaviours and the nature of sexual selection in *Scatophaga stercoraria* L. (Diptera: Scatophagidae) IV. Epigamic recognition and competition between males for the possession of females. *Behaviour* 37: 8-139. 1970b.

PASINI, M.E., REDI, C.A., CAVILGLIA, O., PEROTTI, M.E., Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. *Tissue & Cell* 28: 165-175. 1996.

PEREIRA-LOURENÇO, A., SANTOS – MALLETT, J. R., FREITAS, S. P. C. Anatomy of the Spermatophore in the Triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its applications to the study of Chagas Diseases Vector Biology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.89, n.4, p.775-780. 2013.

PIRES, H. H. R., LORENZO, M. G., LAZZARI, C. R., DIOTAIUTI, L., MANRIQUE, G. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 95-300. 2004.

PHILLIPS, D. M. Insect sperm: Their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.* 44(2): 243–277.1970.

POINAR, J. R. G. *Triatoma dimidiata* sp.n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and *Triatoma antiquus* sp.n (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a Triatomine-Trypanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5(1):72-81. 2005.

- POINAR, J. R. G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). In mid-Cretaceous amber northern Myanmar. *Cret Res* 93: 90-97. 2019.
- ROMAÑA, C. & ABALOS, J. *Triatoma delpontei* n.sp. (Hemiptera, Reduviidae). *Anales del Instituto de Medicina Regional, Tucumán*, 2, 79–93. 1947.
- ROJAS, J. C. Mating Behavior of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Ann Entomol Soc Am* 83: 598-602. 1990.
- ROJAS, J.C., LOPEZ, C. L. Sexual behavior in two species of *Triatoma phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol* 29: 13-18. 1992.
- ROSA, J. A., ROCHA, C. S., GARDIM, S., PINTO, M. C., MENDONÇA, V. J., FERREIRA-FILHO, J. C. R., CARVALHO, E. O. C., CAMARGO, L. M. A., OLIVEIRA, J., NASCIMENTO, J. D., STEINDEL, M., ALMEIDA, C. E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, v. 3478, p. 62-76. 2012.
- ROSA, J. A, BARATA, J. M., SANTOS, J. L. F., CILENSE, M. Morfologia dos ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saúde Pública*, 34 (5): 538-542. 2000.
- ROSSITER, M., STADDON, B. W. 3-Methyl-2hexanone from the triatinae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera: Reduviidae). *Experientia* 39:380-381. 1983.
- SALVATELLA, R., ROSA, R., BASMADJIAN, Y., PUIME, A., CALEGARI, L., GUERRERO, J., MARTINEZ, M., MENDARO, G., BRIANO, D., MONTERO, C., SANTOS, C. M., 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, C. M., JURBERG, J., GALVÃO, C., MARTÍNEZ, M. Morfometria comparada de *Triatoma infestans*, *T. rubrovaria* e *T. platensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Uruguai. *Iheringia. Série Zoologia*. 99: 56-60. 2009.
- SANTOS, H. P., ZAMA, U., DOLDER, H., LINO-NETO, J. Sperm morphology of *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae). *Micron* 51: 36-40. 2013.
- SANTOS SOUZA, E.; ATZINGEN, N. C. V.; FURTADO, M.B.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; VENDRAMI, D. P.; GARDIM, S.; ROSA, J. A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. *ZooKeys* 621: 45–62. 2016.

SILLÉN-TULLBERG, B. Prolonged copulation: a male postcopulatory strategy in a promiscuous species, *Lygaeus equestris* (Heteroptera: Lygaeidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 9, 283-289. 1981.

SANTOS-MALLET, J.R.; CARDOZO-DE-ALMEIDA, M.; CORRÊA NOVO, S.; GONÇALVES, T.C.M. Morfologia externa de *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Através da Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura. *Entomo Brasiliis* 1(2): 37-42. 2008.

SHERLOCK, I. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. . *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, RJ, v. 95, n.5, p. 611-613, 2000.

SORDILHO, C. M. O. & ALMEIDA, J. R. Comportamento de corte e cópula de *Triatoma pseudomaculada* Corrêa & Spinola, 1964 (Hemiptera Reduviidae) sob condições de laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 17, 47-69. 1988.

SCHOFIELD, C. J. & GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, p. 88–100. 2009.

SCHOFIELD, C. J., DIOTAIUTI, L., DUJARDIN, J. P. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl 1), p. 375-378. 1999.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the Triatominae, In: Service M.W. (Ed.). *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Oxford: Clarendon Press, p. 281-312, 1988.

SCHOFIELD, C. J. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull. Entomol. Res.* 69:363-379. 1979.

SILVA, I. G. Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) e no xenodiagnóstico. Tese de doutorado. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1985.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saúde Pública*, v. 16, p. 35-42, 2000.

SILVEIRA, A. C., REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 27 (Supl III): 11-22. 1994.

SILVEIRA, A. C., FEITOSA, V. R. & BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Rev Brasileira Malariologia e Doenças Trop*, 36 : 15-312. 1984.

SNOOK, R.S. & KARR, T. L. Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. *Curr. Biol.* 8: 291–294. 1998.

SNOOK, R. S. *Evolution* 51(3):797,1997.

SWALLOW, J. G. & WILKINSON, G.S. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol. Rev.* 77: 153-182. 2002.

TANEJA, J. & GUERIN, P. M. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *J Comp Physiol A*, 181: 21-34. 1997.

TANEJA, J. & GUERIN, P. M. Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. *J Comp Physiol A* 176: 455-464. 1995.

WEIRAUCH, C. & SCHUH, R. T., Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Ann. Rev. Entomol.* 56: 487-510. 2011.

WISNIVESKY-COLLI, C. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90: 325-328. 1995.

TRIPLEHORN, C. A., JONNISON, N. F. Ordem Hemiptera. In *Estudo dos insetos*. 7^a ed. São Paulo: Cengage Learning. pp. 270-334. 2011.

THORNHILL, R. & ALCOCK, J. The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge, USA, pp. 547. 1983.

VITTA, A. C. R. Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae: Triatominae). (Tese Doutorado: Ciências da Saúde). Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 166. 2009.

VITTA, A. C. R. & LORENZO, M. G. Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol* 46: 789-795. 2009.

ZELEDÓN, R. *Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. Trypanosomiasis and Leishmaniasis with reference to Chagas' disease.* 20 Amsterdam; Ciba Foundation Symposium new series, p.51-85. 1974.

8. ANEXO