

**ASPECTOS EXOCORIALES DE HUEVOS
DE *Triatoma patagonica* DEL PONTE, 1929 POR
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Elena Visciarelli ⁽¹⁾, Adriana Ferrero ⁽²⁾ & Sixto Raúl Costamagna ⁽¹⁾

Abstract

Exochorial aspects of eggs of *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929 shown by scanning electron microscopy- The geometrical patterns of egg cells of *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929, a species considered to be an active vector of Chagas' disease, were studied by scanning electron microscopy (SEM). Eggs of known age were selected according to their morphological characteristics, namely those which were 5 days old, 14 days old, and those which were hatched. Images of the exochorion were registered in the cephalic, caudal, and medial areas. The results showed that *T. patagonica* eggs evidence that in their cephalic and caudal areas, cells have either an hexagonal, pentagonal, or quadrilateral configuration, while in the medial area, cells have mainly an hexagonal configuration. It was also observed that the geometrical patterns of the different parts of the egg undergo no changes during embryonal development.

Key words: *Triatoma patagonica*, ultrastructure, Chagas' disease, Triatominae, eggs

(1) Cátedra de Parasitología Clínica; (2) Cátedra de Zoología de Invertebrados II. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, 8000 Bahía Blanca, Prov. de Buenos Aires, Argentina. E-mail: evisciar@criba.edu.ar

Recebido em: 15/07/2004.

Aceito em: 17/12/2004.

Resumen

Se estudiaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) los patrones geométricos de las células de huevos de *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929, especie considerada vector activo de la enfermedad de Chagas. Se seleccionaron huevos de edad conocida: 5 días, 14 días y eclosionados, según sus características morfológicas y se registraron imágenes del exocorion en las zonas cefálica (opérculo), caudal y media. Los resultados obtenidos mostraron que los huevos de *T. patagonica* presentan en sus zonas cefálica y caudal, células con forma de hexágonos, pentágonos y cuadriláteros y en la media principalmente hexágonos. Se observó que los patrones geométricos de las distintas partes del huevo no cambian durante el desarrollo embrionario.

Palabras claves: *Triatoma patagonica*, ultraestructura, Enfermedad de Chagas, Triatominae, huevos

Introducción

T. patagonica Del Ponte, 1929, es un triatomino ampliamente distribuido en Argentina, se halla desde el paralelo 28° Latitud Sur, en Tinogasta, Catamarca, hasta Lago Blanco en el paralelo 46° Latitud Sur en la provincia del Chubut, siendo este el límite más austral que alcanzan los triatominos (Mazza, 1937; Carcavallo & Martinez, 1985; Galvão *et al.*, 2003).

Es una de las especies más ubicuistas encontrándose en ecotopos salvajes, peridomiciliarios y en la vivienda humana (Lent & Wygodzinsky, 1979; Ferrero *et al.*, 1999) y está considerada vector activo de la enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky, 1979). Ha sido hallada naturalmente infectada con *Trypanosoma cruzi* (Abalos & Wygodzinsky, 1951) y ha sido probada también su capacidad de infectarse en forma experimental con este protozooario (Mazza, 1937) y con *Trypanosoma rangeli* (D'Alessandro, 1972). Estudios sobre su comportamiento alimentario demostraron que *T. patagonica* defeca tanto inmediatamente como durante la alimentación (Nattero *et al.*, 2002). Todas estas características biológicas posicionan a esta especie como vector real de la Enfermedad de Chagas.

Para lograr el objetivo de interrumpir la transmisión vectorial, es necesario continuar con el estudio de especies relevantes como vectores

secundarios de la Enfermedad de Chagas, poniendo interés especialmente en aquellos estadios morfológicamente poco conocidos entre los cuales se encuentran los huevos (Barata 1998).

Desde que Galliard (1935a), demostró que los huevos de los insectos tenían una estructura corionica característica diversos autores han abordado este tema. Hinton (1981) estudió la morfología macroscópica y del corion de casi todos los ordenes de la clase Insecta. Varios autores han estudiado la morfología de huevos de distintos generos y especies de la Subfamilia Triatominae, entre los cuales se encuentran: Briceño-Iragorry (1934), Barth & Muth (1958), Barata (1981;1998), Costa *et al.* (1991), Jurberg *et al.* (1993), Rosa *et al.* (2000) y Jurberg *et al.* (2002).

Abalos & Wygodzinsky (1951), elaboraron una clave para la diferenciación de especies de triatominos basada en la microestructura corionica. Según Lucena & Rego (1969) los polígonos del exocorion de huevos de triatominos pueden variar su número de lados entre 5 y 8. Lent & Wygodzinsky (1979) concluyen que en los triatominos el aspecto del corion de los huevos es especie específico, con excepción de *Triatoma proctata* (Uhler, 1894), especie en la cual varía según la población.

Dentro del género *Triatoma*, las especies estudiadas (Barata,1998) presentan huevos de forma elíptica, simétricos o ligeramente asimétricos y operculados. La mayoría carece de cuello y otros tienen un cuello suavemente insinuado. En ninguna especie se observó collar y en la mayoría el opérculo es casi plano, con estructuras como las de corion o sin ellas. Los huevos de algunas especies tienen opérculos prominentes y con estructuras complejas visibles con poco aumento. La cáscara o corion es ligeramente translúcida y los huevos recién puestos son blanquecinos y van cambiando a amarillento o rosado, intensificando el color a medida que el embrión se desarrolla. Esto es debido a la pigmentación del embrión que se hace visible por transparencia dado que el corion permanece blanco.

En la mayoría de las especies del género *Triatoma* se observan diseños exocoriales con presencia de "células hexagonales", pero algunas especies como *Triatoma barberi* Usinger, 1939 no presentan ningún dibujo en el corion. Pueden observarse perforaciones concéntricas en el interior de los polígonos como en *Triatoma infestans* o estructuras complejas como en *Triatoma delpontei* Romaña & Abalos, 1947. Las líneas limitantes de las células poligonales, cuando están presentes, pueden mostrar variados diseños. Se observan diferencias también en el borde corial, anillo corionico donde apoya el opérculo, que puede ser delgado y continuo al

plano de la cáscara o grueso, con rugosidades y en un plano diferente al del corion (Barata, 1998).

Mazza (1937) estudió los huevos de *T. patagonica* por microscopía óptica y observó en el exocorion un dibujo en mosaico bastante regular formado por pentágonos y hexágonos irregulares en cuyo interior se apreciaba un punteado grosero.

Los huevos de *T. patagonica* miden en promedio 1,8 mm de largo x 1 mm de ancho, y son ovales desde su postura hasta el día 5 del desarrollo en que aparece una hendidura dorsal que se acentúa progresivamente hasta la eclosión (Visciarelli et al., 2001). El tiempo total de desarrollo embrionario a 28°C ± 1 y 60-70% de H.R fue de 16 ± 1 día (Visciarelli et al., 2001).

De acuerdo a lo expuesto, el objetivo general de nuestro trabajo fue estudiar por microscopía electrónica de barrido los patrones geométricos de las células de distintas partes de la superficie del huevo de *T. patagonica*: cefálica u opérculo, zona media y caudal, a fin de realizar una contribución al conocimiento de esta especie considerada vector activo de la enfermedad de Chagas. Los objetivos particulares fueron: observar si se presentan cambios durante el desarrollo embrionario a fin de establecer una correlación entre la edad y el aspecto exocorial y aportar una herramienta que podría tener importancia taxonómica para diferenciar *T. patagonica*, principalmente, de *T. sordida* y *T. guasayana*, especies morfológica y ecológicamente muy relacionadas (Usinger et al., 1966), con superposiciones en sus distribuciones geográficas y cuya diferenciación ha resultado muchas veces dificultosa. Recientes estudios taxonómicos han propuesto la organización de las especies en grupos o complejos de especies. Dentro del Complejo específico *Triatoma sordida* se incluye a la especie que le da el nombre, a *T. patagonica*, a *T. guasayana* y a la recientemente revalidada *T. garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967 por Jurberg et al. (1998).

Material y Metodos

Se trabajó con colonias de *T. patagonica* iniciadas en 1988 en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Esta colonia se obtuvo a partir de ejemplares recogidos en

estudios llevados a cabo en la ciudad de Río Colorado, Provincia de Río Negro, Argentina (Ferrero *et al.*, 1999). Los insectos fueron mantenidos a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y 60% - 70% de H.R y alimentados semanalmente sobre palomas (*Columba livia*).

Se seleccionaron huevos de *T. patagonica* de edad conocida según sus características morfológicas (Visciarelli *et al.*, 2001): 5 días, 14 días y eclosionados (cáscaras) y se registraron imágenes del exocorion en la zona cefálica (opérculo), la zona caudal y la zona media.

La preparación del material para realizar microscopía electrónica se llevó a cabo siguiendo los procedimientos clásicos para especímenes biológicos (Marchant, 1973) con algunas modificaciones (Costamagna, 1996). Los huevos se fijaron con glutaraldehído al 2 % en buffer fosfato 0,05 M, pH: 7,2 a 4°C y se guardaron en tubos plásticos durante una semana en heladera (4 a 6°C). Luego fueron lavados con buffer fosfato 0,05 M, pH: 7,2 realizando tres lavados con 2 ml de buffer por vez, reemplazándolo cada 15 minutos. Posteriormente se procedió a la deshidratación con distintas concentraciones de acetona Merck pro-análisis, según la serie 25%, 50%, 75% y finalizando en acetona pura. Cada concentración de acetona se mantuvo en contacto con la muestra durante 15 minutos y se realizaron tres lavados con cada concentración. Todo el procedimiento se realizó a 4°C y a partir de la deshidratación con acetona 75% a temperatura ambiente. Las muestras, en acetona 100% fueron secadas por punto crítico (Polaron^R, Watford, England) y fueron montadas en portamuestras con cinta doble faz. Se las cubrió con oro en aparato Ted Pella Inc^R, Redding, CA, USA. La observación se realizó en microscopio electrónico de barrido marca JEOL^R 35 CF a 6KV. Las micrografías fueron realizadas con Kodak^R Electron Image-film, VP-120.

Resultados

Los huevos de *T. patagonica* poseen un operculo apical y son perfectamente ovales desde su postura hasta la aparición de una hendidura el día 5 del desarrollo embrionario, presentando a partir de entonces una cara dorsal cóncava y una ventral convexa (Fig. 1. a, b). Son simétricos, no presentan ni cuello, ni collar y se observa un borde corial en forma de anillo muy delgado, prácticamente contiguo al plano del opérculo y de la cáscara (Fig. 2. a, b).

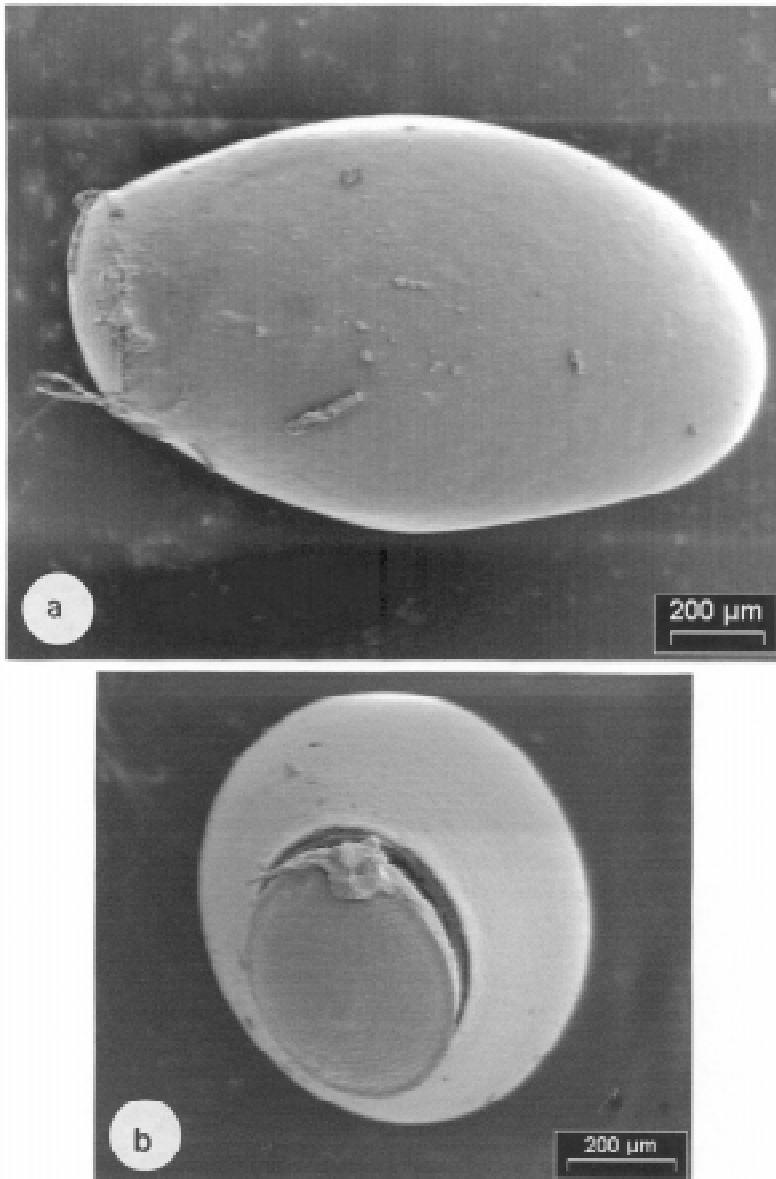


Figura 1: Aspecto general del huevo de *T. patagonica*. Edad: 5 días. a- Se distingue lateralmente la hendidura dorsal; b- Opérculo desprendiéndose y borde corial.

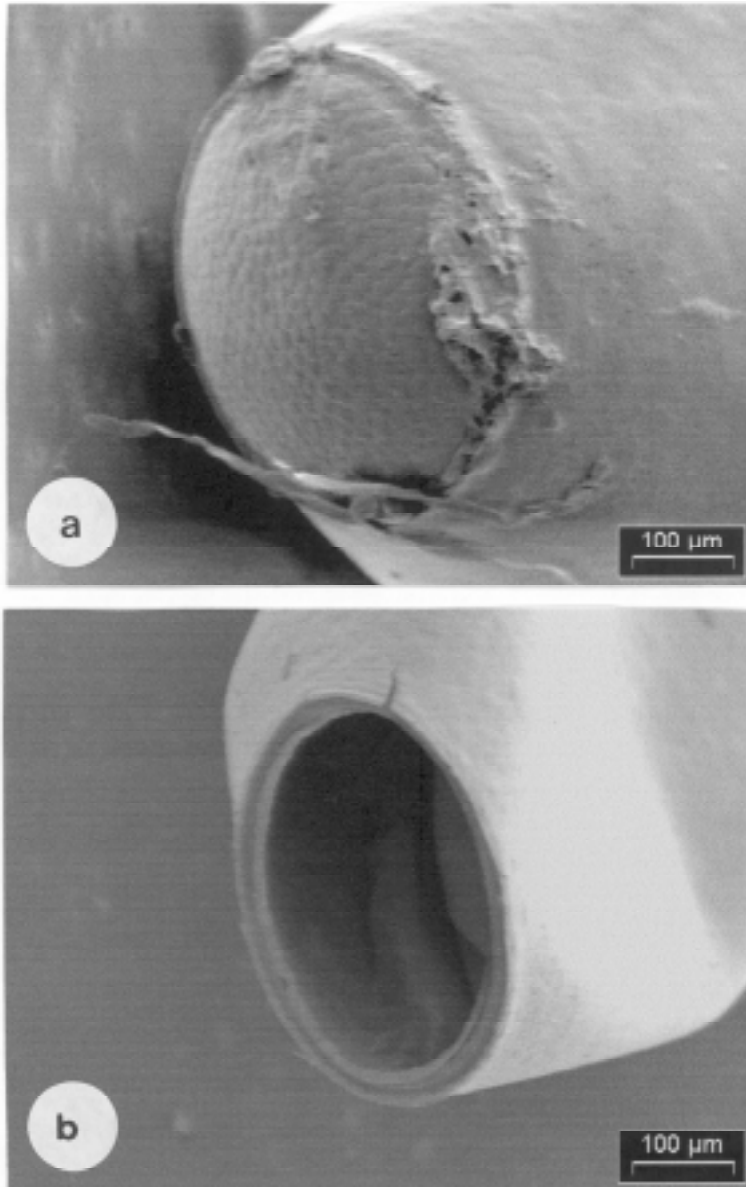


Figura 2: Aspecto general de la zona cefálica del huevo de *T patagonica*. Edad: 5 días. a- Se observan “células poligonales” y borde corial; b- Borde corial.

En todas las zonas del corion se observan predominantemente "células hexagonales" con cierta variabilidad en las distintas partes del huevo. En la zona cefálica (opérculo) se aprecian diversos polígonos dispuestos en mosaico: principalmente hexágonos y pentágonos y en menor proporción, cuadriláteros (Fig. 3. a, b). En la zona media se encuentran predominantemente células hexagonales (Fig. 4) y en la zona caudal el patrón geométrico es similar al del opérculo, es decir, con diversidad de formas geométricas (Fig. 5).

De manera que, los huevos de *T. patagonica* presentan en sus zonas cefálica y caudal células con forma de hexágonos, pentágonos y cuadriláteros, y en la media principalmente hexágonos.

El análisis de las microfotografías permite observar que las figuras geométricas están separadas por líneas limitantes delgadas y bien definidas. La superficie corionica se presenta con granulaciones abundantes e irregulares (Fig. 6. a) y con numerosas perforaciones desordenadamente distribuidas (Fig. 6. b). No se observa ningún diseño sobre las líneas limitantes, ni estructuras complejas dentro de las células hexagonales (Fig. 4).

La observación de las imágenes registradas en huevos de 5 días, 14 días y eclosionados (cáscaras) permite establecer que la microestructura del corion de los huevos de *T. patagonica*, no varía a lo largo del desarrollo embrionario, es decir, que la distribución de células poligonales no cambia en el tiempo en las distintas partes del huevo.

Discusion

Dentro de la Subfamilia Triatominae, la observación de los aspectos exocoriales permite realizar la identificación de los géneros estudiados, salvo en *Triatoma* que no presenta un patrón homogéneo y solo es posible agrupar especies con aspectos morfológicos comunes que caracterizarían a este género. Hay gran variabilidad entre los géneros y gran homogeneidad entre las especies dentro de cada género. Además se observan homologías entre especies de distintos géneros (Barata,1998). De manera que las características exocoriales serían adecuadas para reconocer géneros y no tan eficientes para la separación de especies en cada género, para lo cual se requeriría de un conocimiento más profundo.

Según Barata (1998) las especies del género *Triatoma* se pueden separar en dos grupos básicos según su arquitectura corionica. El estudio

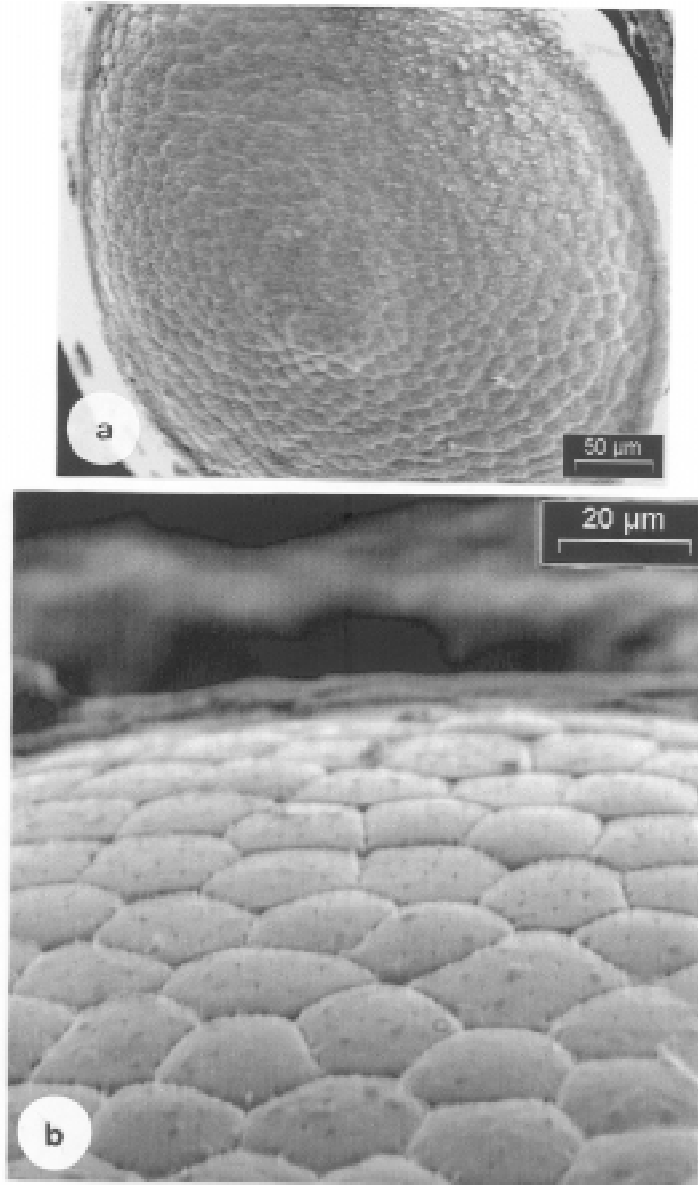


Figura 3: Opérculo del huevo de *T. patagonica*. Edad: 14 días. a- Se observa el acomodamiento de los polígonos para cerrar la estructura; b- Mosaico de “células poligonales” con límites definidos, superficie granulosa y cribada.

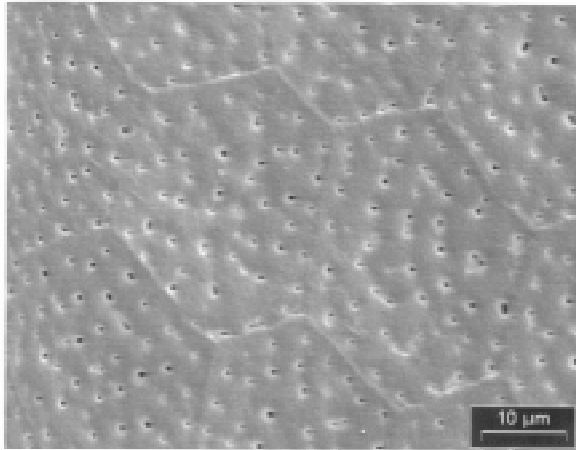


Figura 4: Aspecto general del exocorion y de las “células hexagonales” del huevo de *T. patagonica*. Edad: 14 días.

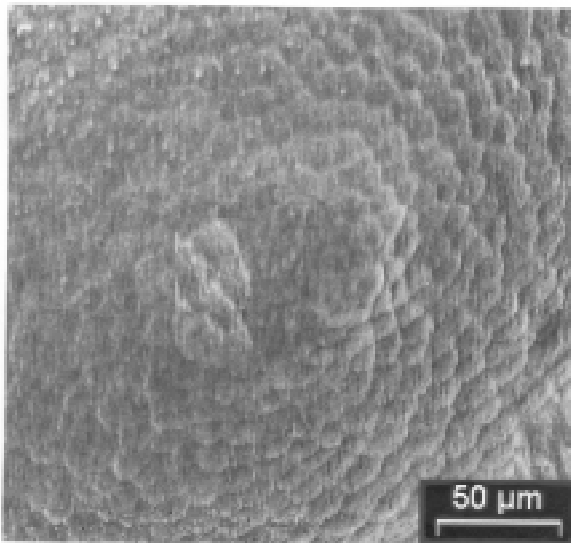


Figura 5: Aspecto general de la zona caudal del huevo de *T. patagonica*. Edad: 5 días.

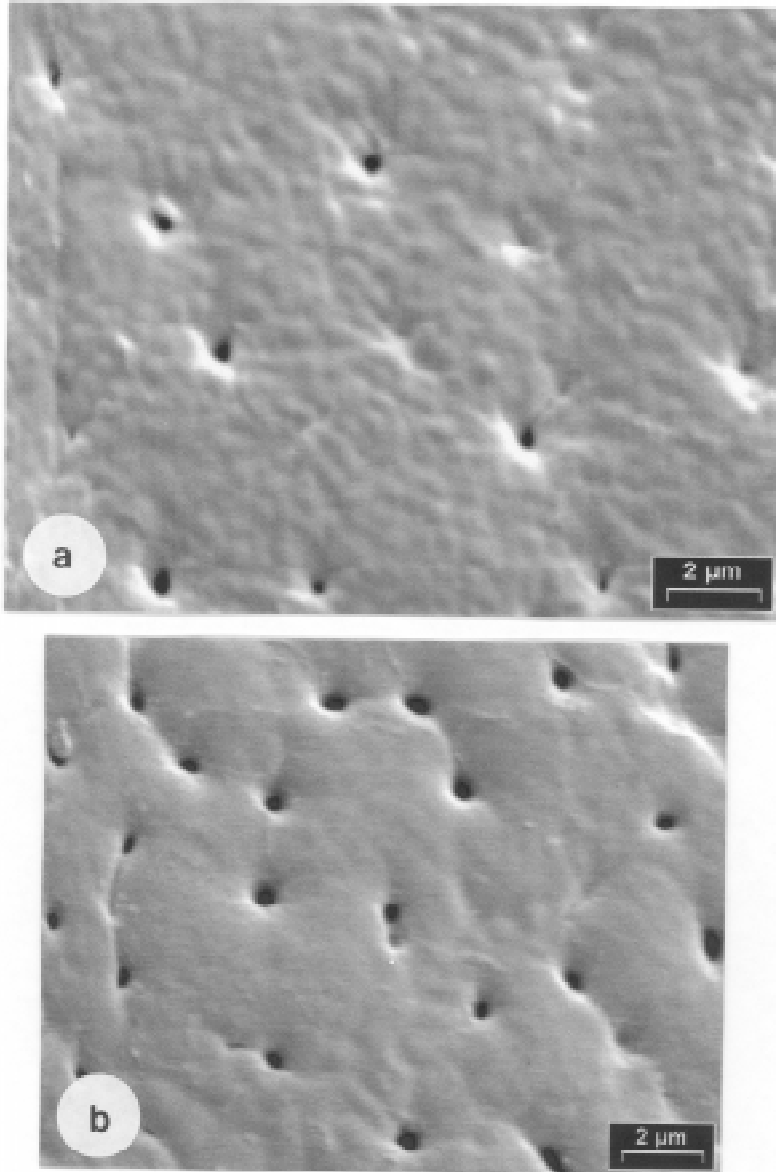


Figura 6: Aspecto general del exocorion de huevos eclosionados de *T. patagonica*. a- Superficie con granulaciones abundantes e irregulares; b- Numerosas perforaciones irregularmente distribuidas

de los aspectos exocoriales de *T. patagonica*, permite incluirla en el grupo I, donde se encuentran las especies que presentan células hexagonales en el corion, con perforaciones, sin cuello ni collar y con el borde corial continuo al plano de la cáscara y del opérculo. Las especies incluidas en el grupo II, no tienen arquitectura corionica definida, presentan anillo corial ancho, liso o rugoso y en un plano distinto al de la cáscara y el opérculo.

Las formas poligonales en el corion son impresas por las células epiteliales de las glándulas ováricas (Galliard, 1935 b.). Si se considera que la presencia de dibujos poliédricos se extiende a varios ordenes de insectos (Sierra *et al.*, 1995, Sites & Nichols, 1999) y que existe escasa variabilidad entre las células poligonales en la superficie del corion en numerosos ordenes de insectos, sería discutible su utilidad taxonómica en niveles inferiores a la clase Insecta.

En cuanto a la distribución de las células poligonales obedecería a una necesidad estructural, ya que en las zonas cefálica y caudal del corion deben existir figuras geométricas distintas de hexágonos que permitan al huevo cerrarse, mientras que en la zona media, que es curva o ligeramente curva, pueden extenderse células hexagonales (Chaves & Añez, 2003). Esta disposición poliédrica sería comparable a la de un sólido de Arquímedes (Zamora *et al.*, 2000).

El aspecto exocorial de los huevos de *T. patagonica* no cambia durante el desarrollo embrionario, de manera que no se puede establecer una correlación entre la edad de los huevos y la descripción del patrón geométrico. Tampoco se han observado cambios durante este periodo en *R. prolixus* (Chaves & Añez, 2003).

Mazza (1937) señalaba que la semejanza entre ejemplares de *T. patagonica*, *T. sordida* y *T. guasayana* se extendía también a la forma, tamaño y dibujo de los huevos que presentaban una arquitectura muy similar. El estudio de los aspectos exocoriales en poblaciones argentinas de estas dos especies epidemiológicamente comprometidas con *T. patagonica* en nuestro país, permitiría ampliar o restringir el concepto expuesto.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con el apoyo económico de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina y forma parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Bioquímica Elena C. Visciarelli.

Referencias Bibliográficas

- Abalos, J.W. & Wygodzinsky, P., 1951. Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). **An. Inst. Med. Reg.** **2**:1-179.
- Barata, J.M.S., 1981. Aspectos morfológicos de Ovos de Triatominae II. Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do género *Rhodnius* (Stal, 1859) (Hemiptera-Reduviidae). **Rev. Saude Publica** **15**:490-542.
- Barata, J.M.S., 1998. Volumen II, pp. 409-448. Chapter 10: Macroscopic and Exochorial Structures of Triatominae Eggs (Hemiptera, Reduviidae). *In: Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas* (R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent eds.). Editora Fiocruz-Rio de Janeiro.
- Barth, R. & Muth, H., 1958. Estudos anatómicos e histológicos sôbre a sub-familia Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) VIII parte: Observaões sôbre a superfície dos ovos das espécies mais importantes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **56**:197-208.
- Briceño-Iragorry, L., 1934. Contribución al estudio morfológico de los huevos de algunos reduvideos. **Bol. Soc. Ven. Cienc. Nat.** **2**:397-400
- Carcavallo, R.U. & Martinez, A., 1985. Tomo I:149-208. Capítulo XIV: Biología, ecología y distribución geográfica de los triatominos americanos, *In: Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas* (R.U. Carcavallo, J.E. Rabinovich & R.J. Tonn). Servicio Nacional de Chagas, Ministerio de Salud y Acción Social, República Argentina.
- Chaves, L.F. & Añez, N., 2003. Geometría de las células del exocorion de huevos de *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859) (Heteroptera: Reduviidae). **Entomotrópica** **18**:1-5.
- Costa, J.M.; Jurberg, J. & Barth, M.O., 1991. Estudos morfológicos de *Cavernicola lenti* Barreto y Arias, 1985 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **86**:247-263.

- Costamagna, R.S., 1996. Processing *Trichomonas vaginalis* for Scanning Electron Microscopy. **Microsc. Res. Techn.** **35**:357-358.
- D'Alessandro, A., 1972. New Experimental Vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. **J. Med. Entomol.** **9**:187-195.
- Ferrero, A.A.; Visciarelli, E.C.; Torno, O. & Costamagna, S.R., 1999. Presencia de *Triatoma patagonica* en viviendas humanas en la ciudad de Rio Colorado, Provincia de Rio Negro. **Rev. Soc. Entomol. Argent.** **58**:79-84.
- Galvão, C.; Carcavallo, R.U.; Rocha, D.S. & Jurberg, J., 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa** **202**:1-36.
- Galliard, H., 1935a. Recherches sur les Réduvides Hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. V Morphologie de l'oeuf des Triatomines. **Ann. Parasit. Hum. Comp.** **13**:511-527.
- Galliard, H., 1935b. Recherches sur les Réduvides Hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. IV Organes Génitaux Femelles. **Ann. Parasit. Hum. Comp.** **13**:497-527.
- Hinton, H.E., 1981. **Biology of insect eggs**. Oxford, Pergamon Press, 3 v.
- Hypsa, V.; Tiez, D.F.; Zrzavý, J.; Rego, R.O.M.; Galvão, C. & Jurberg, J., 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol. Phyl. Evol.** **23**:447-457.
- Jurberg, J.; Galvão, C.; Lent, H.; Monteiro, F.; Lopes, C.M.; Panzera, F. & Perez, R., 1998. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martinez, Prozen & Ronderos, 1967 (Hemiptera-Reduviidae) **Entomol. Vect.** **5**:107-122.
- Jurberg, J.; Fagundes, L.M & Barth, O.M., 1993. Estudo morfológico de ovos e ninfas de *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) (Hemiptera, Reduviidae, Tritominae). **Rev. Bras. Biol.** **53**:269-283.

- Jurberg, J.; Silva, M.B.A.; Galvão, C.; Rocha, D.S.; Barbosa, H.S. & Carcavallo, R.U., 2002. Descrição dos ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent 1998, vistos através de microscopia óptica y eletrônica de varredura. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **97**:209-216.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** **163**:125-520.
- Lucena, D. & Rego, M., 1969. Microestrutura do Exocório de Ovos de Triatomíneos de Nordeste do Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** **11**:87-93.
- Marchant, H.J., 1973. Processing small delicate biological specimens for scanning electron microscopy. **J. Microsc.** **97**:369-371.
- Mazza, S., 1937. Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas. II Posición sistemática de *Eutriatoma (Triatoma) patagonia*. Universidad de Buenos Aires. **Misión de Estudios de Patología Regional Argentina**, Jujuy. Publicación N° 30 M.E.P.R.A, 29 p.
- Nattero, J.; Crocco, L. ; Rodríguez, C., 2002. Feeding and defecation behaviour of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **97**:1063-1065.
- Rosa, J.A.; Barata, J.M.; Santos, J.L. & Cilense, M., 2000. Morphology of the eggs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria*. **Rev. Saude Publica** **34**:538-542.
- Sierra, D., Vrlez, I., Uribe, S., 1995. Electronic microscopy of eggs as a taxonomic parameter. **Bol. Malariol. Sanit. Amb.** **35**:327-336.
- Sites, R. & Nichols, B., 1999. Egg architecture of Naucoridae (Heteroptera): internal and external structure of the chorion and micropyle. **Proc. Entomol. Soc. Wash.** **101**:1-25.

Usinger, R.L.; Wygodzinsky, P. & Ryckman, R.E., 1966. The biosystematics of Triatominae. **Ann. Rev. Entomol.** **11**:309-330.

Visciarelli, E.; Ferrero, A. & Picollo, M., 2001. Caracterización morfológica del desarrollo embrionario de *Triatoma patagonica* Del Ponte 1929 (Hemiptera, Reduviidae). **Entomol. Vect.** **8**:449-461.

Zamora, E.; Chaves, L.F.; Aldana, E.; Lizano, E. & Valiente, E., 2000. Estudio anatómico del tubo ovárico de *Rhodnius prolixus* utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB). **Acta Microscop**:132-133.