

DANIELLA BARRETO SANTANA

**Biologia comparativa de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*
(Triatominae) sob condições de laboratório e infecção experimental pelo
Trypanosoma rangeli com ênfase nos aspectos ultraestruturais das glândulas
salivares infectadas.**

Pós-graduação em Ciências da Saúde
Universidade de Brasília – UnB

Brasília
2006

DANIELLA BARRETO SANTANA

**Biologia comparativa de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*
(Triatominae) sob condições de laboratório e infecção experimental pelo
Trypanosoma rangeli com ênfase nos aspectos ultraestruturais das glândulas
salivares infectadas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como
requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADOR:
Prof. Dr. Cesar Augusto Cuba Cuba

Brasília
2006

DANIELLA BARRETO SANTANA

**Biologia comparativa de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*
(Triatominae) sob condições de laboratório e infecção experimental pelo
Trypanosoma rangeli com ênfase nos aspectos ultraestruturais das glândulas
salivares infectadas.**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pelos membros componentes da banca examinadora:

Prof. Dr. César A. Cuba Cuba
(Orientador)

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bao

Prof. Dr. Gustavo Sierra Romero

Brasília
2006

*Ao meu esposo Marco, que esteve sempre ao meu lado, ajudando no que fosse preciso.
Às minhas mães Rosana e Cristina e ao meu irmão Danilo que mesmo de longe estão
presentes na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador César Augusto Cuba Cuba, um agradecimento especial pela confiança, incentivo, apoio e conselhos dados que ajudaram na elaboração do meu trabalho.

À Prof. Dra. Sônia Bao, pelo carinho e apoio em todo o processo para a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa, pela atenção e auxílio na leitura das lâminas histológicas.

À estagiária e amiga Jacqueline, pelo carinho, coleguismo e pela ajuda na coleta de dados e manutenção da colônia de triatomíneos do laboratório.

Ao estagiário Jonatas, pelo apoio na coleta de dados, pelo companheirismo e pelas brincadeiras que animam todas as pessoas do Laboratório de Parasitologia Médica.

À Daniella de Souza, também mestranda do Laboratório, pelo companheirismo e carinho durante esses dois anos.

Ao Rodrigo Gurgel, doutorando do Laboratório, pela ajuda com os dados e com a elaboração do meu trabalho.

À Maria de Lourdes Souto (Lurdinha), técnica do Laboratório, pela atenção e pelo ensino.

Ao Tércio e à Viviane, do Laboratório de Dermatologia, pela ajuda com materiais e manutenção da cepa criopreservada.

À Shirley, técnica do Laboratório de Patologia, também pela ajuda com materiais.

Ao Bráulio, técnico do Laboratório de Histologia, pelo preparo das lâminas com cortes histológicos.

Ao João Victor, Shélida e Bruno, alunos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela ajuda com o preparo das amostras e registros das infecções no MEV.

Ao Chigueru e ao Walcymar, do Laboratório de Doença de Chagas, pelo apoio na utilização do aparelho de Xenodiagnóstico Artificial.

À funcionária D. Maria Fernanda (Mariazinha) pela ajuda na criação dos camundongos.

Aos funcionários da pós-graduação que sempre me atenderam com o maior carinho.

A todos os meus colegas que passaram esses dois anos caminhando ao meu lado que, de forma direta ou indireta, contribuíram para uma melhor formação,

meu muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivos	
2.1 Objetivos Gerais	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. Material e Métodos	
3.1 Material Biológico	10
3.2 Identificação dos espécimes de <i>Rhodnius</i>	10
3.3 Métodos para o desenvolvimento das colônias de insetos	12
3.4 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos	13
3.5 Alguns aspectos de comportamento alimentar experimental	13
3.6 Estudo anatômico e histológico das glândulas salivares	14
3.7 Suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao <i>T. rangeli</i>	15
3.8 Infecção <i>in vitro</i> das glândulas salivares	16
4. Resultados	
4.1 Identificação dos espécimes de <i>Rhodnius</i>	19
4.2 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos	21
4.3 Comportamento alimentar em relação à transmissão do <i>T. rangeli</i>	23

4.4 Estudo anatômico e histológico das glândulas salivares	31
4.5 Suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao <i>T. rangeli</i>	34
4.6 Infecção <i>in vitro</i> das glândulas salivares	35
5. Discussão	
5.1 Identificação dos espécimes de <i>Rhodnius</i>	42
5.2 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos	43
5.3 Comportamento alimentar em relação à transmissão do <i>T. rangeli</i>	44
5.4 Estudo anatômico e histológico das glândulas salivares	46
5.5 Suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao <i>T. rangeli</i>	47
5.6 Infecção <i>in vitro</i> das glândulas salivares	49
6. Conclusões	51
7. Referências Bibliográficas	53
8. Anexo I : Resumo do pôster apresentado na XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses - Uberaba – MG.	64
9. Anexo II: Cópia do pôster apresentado na XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses - Uberaba – MG.	66

RESUMO

Triatomíneos do gênero *Rhodnius*: *R. neglectus* e *R. robustus*, vetores naturais do *Trypanosoma rangeli*, foram identificados utilizando-se as chaves taxonômicas de Lent & Wygodzinsky, 1979 e a morfometria geométrica das asas. Este último confirmou sua utilidade como parâmetro de identificação taxonômica em triatomíneos do gênero *Rhodnius*. No estudo comparativo das estatísticas vitais e dos aspectos de comportamento alimentar, os triatomíneos das duas espécies foram observados diariamente para se estabelecer: (i) o período de desenvolvimento dos estádios ninfais; (ii) percentual de mortalidade; (iii) detecção do hospedeiro (tempo de aproximação dos triatomíneos ao hospedeiro vertebrado experimental); (iv) número de tentativas de picadas dos insetos no hospedeiro; (v) tempo total do repasto sanguíneo; (vi) índice de picadas; (vii) lapso entre o final do repasto e a primeira defecação; e (viii) quantidade de sangue ingerido. Comparando-se as duas espécies, *R. neglectus* apresentou um período ninfal significativamente menor que *R. robustus*, havendo diferença significativa ($p < 0,001$) para todos os estádios, exceto para Ninfa V. Com relação ao comportamento alimentar, as duas espécies apresentaram os parâmetros bem similares, exceto para o número de picadas onde *R. neglectus* se apresentou significativamente maior para as Ninfas IV e V, e para a quantidade de sangue ingerido onde *R. robustus* apresentou uma média de ingestão significativamente maior que *R. neglectus*. Em *R. robustus*, registrou-se a presença dos dois pares de glândulas (D1 e D2), característica da espécie estudada. Para verificar o potencial vetorial de *T. rangeli* nas espécies de triatomíneos, utilizou-se três procedimentos laboratoriais com a cepa SC-58: infecção via alimentação em camundongo infectado, via inoculação intracelômica e via xenodiagnóstico artificial, mas não houve infecção das glândulas salivares. Após diversas tentativas, *T. rangeli* infectou a hemolinfa em apenas dois triatomíneos, sem progresso de infecção. Com a cepa LP-01, isolada recentemente de *R. neglectus* naturalmente infectado, realizou-se uma tentativa de infecção via alimentação em camundongo infectado, sem demonstrar invasão hemolinfática. Na infecção *in vitro* das glândulas salivares, foi utilizada uma glândula controle (sem infecção) e mais quatro glândulas, infectadas por quatro tempos distintos (30 minutos, 1, 3 e 24 horas), que foram processadas e levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura para verificar e documentar o processo inicial de adesão e penetração na membrana basal. Após o processamento, observou-

se que apenas com 30 minutos e 1 hora de infecção, flagelados encontravam-se aderidos na membrana basal, formando “grumos” com aparência de estar penetrando por orifícios grandes e visíveis. Isto poderia sugerir então que de alguma maneira, os flagelados lesam a membrana basal, com a finalidade de atravessá-la e ganhar passo às células do epitélio glandular.

Palavras chaves: *Rhodnius neglectus*. *R. robustus*. Estatísticas vitais. Comportamento alimentar. *Trypanosoma rangeli*. Suscetibilidade. Glândulas salivares. Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

Rhodnius neglectus and *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Triatominae), two species from the genus *Rhodnius*, were initially identified using the well known taxonomical keys described by Lent and Wygodzinsky (1979) and, in addition, techniques of wings geometric morphometry. Both approaches resulted in good agreement confirming the value of the last one in accurate identification of species of *Rhodnius spp*. Comparative studies on experimental life tables and feeding behavior of *R. neglectus* and *R. robustus* important natural vectors of *Trypanosoma rangeli* in Brazil, were carried out in order to establish: (i) time instars development (ii) mortality (iii) source host detection (iv) average number of bugs' bite on host (v) bloodmeal spending time (vi) biting rate (vii) elapsed time between bloodmeal intake and first defecation (viii) total bloodmeal ingested. Main results of such comparison were: *R. neglectus* have shown a faster development of nymphs than *R. robustus* during all different stages except nymph V ($p < 0,001$). Regarding feeding behavior, if on one hand *R. neglectus* demonstrated a higher number of bites in instar IV and V, on the other hand *R. robustus* have shown higher average of blood uptake. Two pairs of salivary glands (D1 and D2) were recorded in *R. robustus* and histologically described. The vector potential of the two species under study were pursued with challenges using two strains of *T. rangeli* (strains SC58 and LP01). Attempts of experimental infection using mouse infected with the flagellate, artificial xenodiagnosis and intracoelomic injections of cultures of the flagellate, were carried out with partial intestinal and haemolymphatic infections. No invasion of salivary glands were obtained in spite of our repeated efforts. Alternatively, salivary glands "in vitro infections" procedures, in different time-point (30', 1 hour, 24 hours) were performed. Studies on infected glands by light microscopy and scanning electron microscopy (SME) were done. Striking results were the recording of parasites recognition, adhesion and, probably, initial penetration through holes/orifices apparently produce by the flagellum of *T. rangeli* trypomastigotes/epimastigotes on the basal membrane surface. Our interpretation is that the parasite somehow open holes through the basal membrane of the salivary glands when they form clusters of flagellum first, to gain entry into the adjacent glandular epithelium.

Key words: *Rhodnius neglectus*. *R. robustus*. Life cycles. Feeding behavior. *Tripanosoma rangeli*. Susceptibility. Salivary glands. Scanning Electron Microscopy (SME).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica das espécies do gênero <i>Rhodnius</i>	3
Tabela 2. Origem, habitat, coordenadas geográficas e número de asas de machos e fêmeas das populações de <i>Rhodnius</i> estudadas por morfometria geométrica.....	11
Tabela 3: Período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio de <i>R. neglectus</i> e percentual de mortalidade por fase de desenvolvimento.....	22
Tabela 4: Período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio de <i>R. robustus</i> e percentual de mortalidade por fase de desenvolvimento.....	22
Tabela 5: Período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio de <i>R. neglectus</i> e <i>R. robustus</i>	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo evolutivo de <i>T. rangeli</i>	2
Figura 2. <i>R neglectus</i> (Lent, 1954).....	4
Figura 3. <i>R. robustus</i> (Larousse, 1927).....	5
Figura 4. Asa direita de <i>Rhodnius neglectus</i> com os sete pontos de referência usados nas análises morfométricas.....	11
Figura 5. Formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. rangeli</i> da cultura SC-58.....	15
Figura 6. Protocolo utilizado para a infecção experimental " <i>in vitro</i> " das glândulas salivares.....	17
Figura 7. Variação do tamanho do centróide entre populações e sexos de espécies de <i>Rhodnius</i>	20
Figura 8. Mapa fatorial mostrando a variação de forma para machos de populações de <i>Rhodnius</i>	21
Figura 9. Valor médio do tempo de aproximação dos <i>R. neglectus</i> e <i>R. robustus</i>	24
Figura 10. Valor médio do número de picadas de <i>R. neglectus</i> e <i>R. robustus</i> na fonte alimentar.....	25
Figura 11. Valor médio do tempo total do repasto sanguíneo para <i>R. neglectus</i> e para <i>R. robustus</i>	26
Figura 12. Índice de picadas para <i>R. neglectus</i> e para <i>R. robustus</i>	27
Figura 13. Valor médio do número de interrupções durante a alimentação por <i>R. neglectus</i> e por <i>R. robustus</i> . As barras representam o desvio padrão.....	28
Figura 14. Valor médio do tempo entre o final do repasto até a primeira defecação dos <i>R. neglectus</i> e <i>R. robustus</i>	29
Figura 15. Percentuais de defecações para <i>R. neglectus</i> e para <i>R. robustus</i> , por estágio ninfal, somando as observações realizadas durante e após o repasto.....	30
Figura 16. Valores médios (em mg) da quantidade de sangue ingerido por <i>R. neglectus</i> e por <i>R. robustus</i>	31
Figura 17. Vista interna das glândulas salivares de <i>Rhodnius robustus</i>	32

Figura 18. Corte histológico longitudinal pela glândula salivar D1 de <i>Rhodnius robustus</i> corado pelo H. E.....	33
Figura 19. Detalhe da extremidade da glândula salivar D1 de <i>R. robustus</i>	33
Figura 20. Detalhe da parte central da glândula salivar de <i>R. robustus</i>	34
Figura 21. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da glândula salivar não infectada de <i>R. robustus</i>	35
Figura 22. MEV da glândula salivar com infecção de 30 minutos.....	36
Figura 23. Flagelados aderidos à membrana basal da glândula salivar infectada por 1 hora.....	37
Figura 24. Parasitas aderidos em "grumos" na membrana basal da glândula com 3 horas de infecção.....	38
Figura 25. Flagelado aderido na membrana basal com características de forma tripomastigota.....	39
Figura 26. Parasitas cobrindo a membrana basal da glândula salivar infectada por 24 horas.....	40
Figura 27. Glândula salivar de <i>R. robustus</i> utilizada no processo de infecção <i>in vitro</i> em Microscopia Óptica.....	41
Figura 28. Glândula salivar de <i>R. robustus</i> com 3 horas de infecção <i>in vitro</i> , visível à Microscopia Óptica.....	41

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma rangeli é um protozoário hemoflagelado, do subgênero Herpetosoma, que infecta diversas espécies de hemípteros hematófagos e mamíferos, incluindo o homem. Este flagelado foi descoberto na Venezuela por Tejera em 1920 e a partir daí, muitos estudos foram realizados em várias regiões, descobrindo-se sua grande distribuição geográfica. O *T. rangeli* está amplamente distribuído nas Américas Central e Sul, muitas vezes sobrepondo sua distribuição geográfica com outra espécie de tripanosomatídeo, o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas (Cuba Cuba, 1998).

Os insetos triatomíneos principalmente do gênero *Rhodnius*, representam os vetores biologicamente comprovados para o *T. rangeli*, sendo capazes de desenvolver tripomastigotas metacíclicos infecciosos em suas glândulas salivares em circunstâncias naturais e experimentais (Guhl e Vallejo, 2003). Mas este protozoário não é considerado patogênico para os hospedeiros vertebrados, incluindo o homem.

O *T. cruzi* pertence à seção Stercoraria de seu gênero e desenvolve seu ciclo biológico no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, eliminando as formas infectantes nas fezes e na urina do inseto vetor, transmitindo assim, por um mecanismo de contaminação, a Doença de Chagas. Já o *T. rangeli*, que está incluído na seção Salivaria (Hoare, 1972), invade o intestino, coloniza a hemocele do inseto vetor, e posteriormente infecta as glândulas salivares (D'Alessandro & Saravia, 1992), sendo neste caso a transmissão, um mecanismo de inoculação das formas tripomastigotas metacíclicas infectantes pela picada do vetor (Figura 1).

O *T. rangeli* compartilha muitas características Salivaria e Stercoraria, mas está comprovado que o mecanismo principal da transmissão ocorre pela picada dos triatomíneos infectados (Grisard *et al.*, 1999).

De maneira geral, os *Rhodnius* favorecem os estudos da interação parasita/hospedeiro, pois *T. cruzi* e *T. rangeli* são dois parasitas distintos quanto ao ciclo de desenvolvimento no inseto. *Rhodnius neglectus*, Lent, 1954 e *Rhodnius robustus*, Larrousse, 1927 são espécies silvestres, com invasão esporádica às habitações humanas a partir de seus habitats naturais que são diversas espécies de palmeiras (*Arecaceae*) (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004).



Figura 1. Ciclo evolutivo de *T. rangeli*.

As espécies do gênero *Rhodnius* (Tabela 1) possuem uma variedade de hábitos - domiciliares, peridomiciliares e silvestres - e assim a presença de algumas espécies em habitações humanas é muito freqüente. Além disso, há relatos de flagelados de *T. rangeli* em animais e triatomíneos coletados de palmeiras de diferentes regiões do Brasil: *R. pictipes*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *R. domesticus*. As observações de colônias silvestres, em palmeiras e outras plantas como as bromélias, de *R. neglectus* perto de habitações humanas, como também as visitas freqüentes de adultos de *R. prolixus*, *R. pictipes* e *R. robustus* em habitações humanas, indicariam a formação de uma ligação entre *Rhodnius* infectados por *T. rangeli* e as infecções de humanos que foram ou serão estabelecidas (Carcavallo *et al.*, 1998; D'Alessandro e Saravia, 1999; Coura *et al.*, 2002).

Tabela 1. Classificação taxonômica das espécies do gênero *Rhodnius*.

CATEGORIAS TAXONÔMICAS	TAXA
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Hemiptera
Subordem	Heteroptera
Família	Reduviidae
Subfamília	Triatominae
Tribo	Rhodniini
Gênero	<i>Rhodnius</i>
Espécies	<i>Rhodnius amazonicus</i> , <i>R. brethesi</i> , <i>R. nasutus</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. colombienses</i> , <i>R. pictipes</i> , <i>R. prolixus</i> , <i>R. robustus</i> , <i>R. domesticus</i> , <i>R. neivai</i> , <i>R. pallescens</i> , <i>R. ecuadorienses</i> , <i>R. stali</i> , <i>R. milesi</i> .

Fonte: Lent & Jurberg, 1969; Galvão *et al.*, 2003.

R. neglectus (Figura 2) é uma espécie considerada silvestre mas, já foi encontrada em habitações humanas. Em estudos realizados nas regiões norte e nordeste do Estado de São Paulo, e no Estado de Minas Gerais, foram encontradas colônias de *R. neglectus* em domicílios e peridomicílios. Esta espécie está entre as que vem ocupando os nichos vagos, após o controle do *Triatoma infestans* no Estado de Goiás. No ambiente silvestre, esta espécie está associada a várias espécies de palmeiras como o “babaçu” (*Attalea speciosa*) e a “macaúba” (*Acrocomia aculeata*), utilizando como fonte alimentar aves, marsupiais e roedores. No peridomicílio é encontrado principalmente em galinheiros (Barreto *et al.*, 1979; Espínola, 1985; Rocha *et al.*, 2001a).

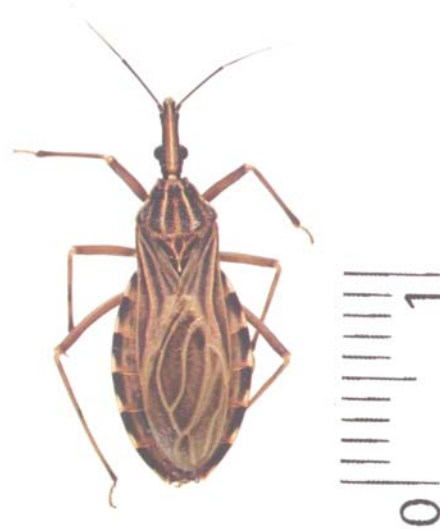


Figura 2. *R. neglectus* (Lent, 1954). Fonte: Paulo H. B. Leite.

R. robustus (Figura 3) teve sua descrição original baseada em um espécime coletado na Guiana Francesa. Esta espécie foi encontrada também na Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela e na região norte do Brasil – município Plácido Castro (Acre), Lago Acari e Rio Madeira (Amazonas) e Belém (Pará). No ambiente silvestre, geralmente é encontrada nas palmeiras *Schelea maracaibensis*, *Attalea speciosa* e *Acrocomia sclerocarpa* e já foi encontrada em peridomicílio e domicílio (Rocha *et al.*, 2001b; Carcavallo *et al.*, 1998).



Figura 3. *R. robustus* (Larousse, 1927). Fonte: Paulo H. B. Leite.

A distribuição geográfica de algumas espécies de *Rhodnius* não é precisa devido à dificuldade de identificação morfológica (Barret, 1988, Soares *et al.* 1999). O uso da morfometria clássica tem sido uma ferramenta útil na caracterização e identificação de populações de Triatominae há bastante tempo (Galíndez Girón & Torres 1999). Com o desenvolvimento das técnicas de morfometria geométrica, as variáveis de forma e tamanho podem ser analisadas separadamente com grande poder estatístico (Rohlf & Marcus 1993). Dessa forma, utilizaremos a morfometria geométrica para a confirmação das espécies utilizadas nesse estudo.

No homem e em reservatórios domésticos ou silvestres a parasitemia do *T. rangeli* é baixa e de curta duração, existindo controvérsias relacionadas com sua reprodução. Vários pesquisadores investigaram o ciclo de vida do *T. rangeli* naturalmente e experimentalmente em seu vetor. Destes estudos sabe-se que o ciclo evolutivo do flagelado apresenta uma fase intestinal, com a passagem para a hemolinfa seguido por sua multiplicação nos hemócitos, até chegar às glândulas salivares onde os tripomastigotas metacíclicos são formados e inoculados nos hospedeiros vertebrados durante a alimentação sanguínea (Cuba Cuba, 1998; revisado por Grisard *et al.*, 1999; Guhl & Vallejo, 2003).

De acordo com Rocha *et al.* (2001a), D'Alessandro (1972) infectou o *R. neglectus* experimentalmente, com *T. rangeli*, e posteriormente encontrou parasitos nas fezes e

glândulas salivares e Diotaiuti *et al.* (1992) o encontraram naturalmente infectado por este parasito no Brasil.

Embora as prevalências humana e animal pelo *T. rangeli* não estejam bem estabelecidas, considera-se ampla a sua distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul (Ramirez *et al.*, 1998). De acordo com Guhl & Vallejo (2003), várias publicações têm demonstrado a presença de *T. rangeli* em humanos por exame direto, hemocultura ou xenodiagnóstico conduzindo para mais de 2.600 casos registrados de infecções em humanos: 1.144 casos na Venezuela; 1.117 na Guatemala; 181 no Panamá; 121 na Colômbia; 61 em El Salvador; 4 em Costa Rica; e 2 casos no Peru (D'Alessandro, 1976, D'Alessandro & Saravia, 1992; Grisard *et al.*, 1999). Coura *et al.* (1996) informou os primeiros casos de infecção humana por *T. rangeli* no Brasil.

A literatura ainda mostra controvérsia quanto à possibilidade das formas intestinais de *T. rangeli* serem capazes de infectar hospedeiros vertebrados, e, portanto completar o ciclo biológico no hospedeiro invertebrado, via tubo digestivo com formação de tripomastigotas metacíclicos, como ocorre com o *T. cruzi*. O parasita desenvolve-se no intestino do inseto, em formas epimastigotas e tripomastigotas (Vallejo *et al.*, 1988). A mais notável característica biológica (relativo a *T. rangeli* no vetor) é apresentada pela penetração do flagelado do intestino para a hemolinfa e invasão das glândulas salivares acompanhado pela formação de tripomastigotas metacíclicos na luz das glândulas e na saliva, ficando infeccioso para o hospedeiro vertebrado através da picada do inseto (Guhl & Vallejo, 2003).

Mas apesar de suas características não patogênicas para hospedeiros vertebrados, o *T. rangeli* induz resposta imune humoral que resulta em elevados níveis de anticorpos (Grisard *et al.*, 1999) que originam reações sorológicas cruzadas com *T. cruzi*, complicando o diagnóstico do parasitismo e a epidemiologia da Doença de Chagas.

Devido à invasão esporádica dos *Rhodnius* ao domicílio humano e à tendência de sinantropismo, o conhecimento de aspectos do seu ciclo de vida é relevante, uma vez que poderá contribuir de maneira eficaz nos estudos de métodos de controle (Rocha, 1994).

Dentre as características que definem um vetor eficiente dos *Trypanosomatidae*, se incluem entre outros o comportamento alimentar, o número e a frequência de dejeções e o número de picadas realizadas durante o processo de alimentação (Diotaiuti *et al.*, 1995).

Várias publicações têm demonstrado as características do ciclo biológico de algumas espécies como *Triatoma infestans*, *T. pseudomaculata* e *T. brasilienses* (Guarneri *et al.*, 2000);

Rhodnius pallescens (Carcavallo, 2002) e *R. neglectus* (Rocha *et al*, 2001a). Silva (1985) estudou o ciclo biológico de 18 espécies de triatomíneos, dentro as quais estavam seis espécies de *Rhodnius*. Outros autores têm demonstrado características de seus hábitos alimentares e dos padrões de defecação durante e após o repasto sanguíneo (Nogueira-Torres *et al*, 2000; Crocco & Catalã, 1996; Nattero *et al*, 2002; Martínez-Ibarra *et al*, 2003a). Mas os experimentos realizados por estes últimos pesquisadores objetivaram correlacionar comparativamente o potencial vetorial das espécies pesquisadas e, inferir sua potencialidade na transmissão do *T. cruzi*.

Todas as espécies de triatomíneos apresentam três pares de glândulas salivares, com exceção do gênero *Rhodnius* que não apresenta a típica glândula D3. De um modo geral, o par de glândulas D1 é sempre reniforme em todos os triatomíneos. As glândulas salivares têm grande diversificação quanto ao número, tamanho, forma e situação nos diferentes triatomíneos. Em geral estão situadas no tórax, onde encontram espaço suficiente para seu desenvolvimento. O deslocamento para a região abdominal resulta dos eventuais movimentos peristálticos dos órgãos vizinhos (Lacombe, 1999). Para a confirmação dessas características, foram realizadas observações anatômicas e histológicas das glândulas salivares do *R. robustus*.

De acordo com Kitajima *et al*. (1998), a invasão das glândulas salivares dos triatomíneos pelo *T. rangeli* foi estudado primeiro, em nível de microscópio óptico, por Groot (1952), seguido por outros autores (Herrer, 1964; Watkins, 1971; Cuba Cuba, 1975b). Poucos trabalhos foram desenvolvidos utilizando a Microscopia Eletrônica, entre eles, Ellis *et al* (1980) e Hecker *et al* (1990) estudaram a infecção das glândulas salivares dos *R. prolixus* e Kitajima *et al* (1998) sobre os *R. ecuadoriensis*.

Recentemente, Meirelles *et al.*, 2005 relataram vários aspectos do processo de invasão das glândulas salivares em *R. domesticus*. Entretanto ainda permanecem pobremente estudados alguns aspectos sobre a morfologia das formas intracelulares (presente nas células glandulares), as características e o processo inicial de penetração das formas (epimastigotas e/ou tripomastigotas) e especialmente o processo de metaciclogênese. Para promover uma informação adicional nos eventos de passagem através dessas células glandulares, foi realizada uma investigação em nível de Microscópio Eletrônico de Varredura, usando-se experimentos *in vitro* de infecção de glândulas salivares de *R. robustus* e sua interação com uma cepa brasileira de *T. rangeli*.

Do ponto de vista epidemiológico, é importante conhecer as características biológicas dos triatomíneos, e uma das maneiras para esse estudo é o estabelecimento das estatísticas vitais obtidas em observações das colônias de laboratório. Em se tratando de um modelo de um tripanosoma como *T. rangeli*, cujo mecanismo de transmissão é do tipo inoculativo (transmissão pela picada) este comportamento de *R. robustus* é de importância na caracterização de seu potencial vetorial.

Sabendo-se que os triatomíneos retiram o sangue diretamente dos vasos sanguíneos (vênulas e arteríolas), os eventos que ocorrem no processo de alimentação incluiriam: detecção do hospedeiro, chegada até ele, movimento exploratório ativo da probóscide pela superfície da pele do hospedeiro, picada ou penetração, localização do sangue (em um vaso sanguíneo), ingestão do sangue e término da alimentação (Guarneri *et al*, 2000).

Assim como outros artrópodes hematófagos, os triatomíneos desenvolveram nas suas glândulas salivares uma grande diversidade de componentes como anticoagulantes, vasodilatadores e anestésicos, que são introduzidos nos hospedeiros, juntamente com a saliva, no momento da picada. Não está ainda bem esclarecido o papel da saliva dos triatomíneos, porém se supõe que ela altere o sítio da picada, favorecendo a localização dos vasos e aumentando o fluxo sanguíneo na área da pele a ser picada. Isso aumentaria as chances de encontro rápido de um vaso com bom suplemento de sangue, que, em consequência, poderia diminuir o tempo de alimentação (Guarneri *et al*, 2000).

Visando compreender ainda mais este processo de alimentação utilizamos experimentos laboratoriais de comportamento que permitiram estabelecer: (i) detecção do hospedeiro (tempo de aproximação dos triatomíneos ao hospedeiro vertebrado experimental); (ii) número de tentativas de picadas dos insetos no hospedeiro; (iii) tempo total do repasto sanguíneo; (iv) lapso entre o final do repasto e a primeira defecação. Todas essas observações de comportamento dos insetos foram realizadas utilizando-se os vetores naturais do *T. rangeli*, como são *R. neglectus* e *R. robustus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais:

a) Estudar comparativamente os aspectos comportamentais e estatísticas vitais em laboratório de duas espécies do gênero *Rhodnius*: *R. neglectus* e *R. robustus*.

b) Verificar o potencial vetorial das espécies de triatomíneos para o *T. rangeli* através do estudo da infecção experimental.

2.2 Específicos:

a) Descrever as estatísticas vitais dos triatomíneos mencionados;

b) Descrever comparativamente as durações do ciclo evolutivo, o tempo e os padrões de alimentação e defecação;

c) Estudar a suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao *T. rangeli*, a taxa de mortalidade e a infecção das glândulas salivares;

d) Observar as características das glândulas salivares de *R. robustus*, quanto ao número, tamanho e forma;

e) Analisar histologicamente as glândulas salivares de *R. robustus*;

f) Realizar tentativas de transmissão do *T. rangeli* através da picada de insetos infectados;

g) Realizar experimentos de infecção *in vitro* das glândulas salivares pelo *T. rangeli* e análise através de estudos morfológicos pela Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura;

h) Contribuir ao conhecimento do fenômeno inicial de adesão e documentação, pela Microscopia Eletrônica de Varredura, dos estágios iniciais da penetração das glândulas salivares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Os insetos utilizados para os experimentos foram provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores (FM/UnB). Os *R. neglectus* foram coletados originalmente na área de Brasília – DF na Reserva Ecológica do IBGE, Córrego Taquara (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004) e os *R. robustus* na área de Benfica, Marabá – PA (Mejía, 2005).

Os parasitas utilizados para as infecções experimentais foram provenientes de uma cepa brasileira de *Trypanosoma rangeli* (SC-58), que foi isolada por Steindel *et al* (1991), de um roedor selvagem, *Echimyus dasythrix* (Grisard *et al.*, 1999) e mantida criopreservada no Laboratório de Parasitologia Médica e a cepa LP-01, isolada muito recentemente de *R. neglectus* naturalmente infectado, procedente de Ituiutaba – MG (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2006a).

3.2 Identificação dos espécimes de *Rhodnius*

A identificação das espécies foi realizada utilizando-se as chaves taxonômicas para espécies da subfamília Triatominae de Lent & Wygodzinsky, 1979. Para confirmar e tornar mais precisa a identificação dos espécimes de *Rhodnius* usados neste estudo, foram aplicadas técnicas de morfometria geométrica de asas reconhecidas na literatura (Matias *et al.*, 2001; Villegas *et al.*, 2002; Schachter-Broide *et al.*, 2004), de acordo com o protocolo desenvolvido por Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2006b.

Foram utilizadas 145 asas provenientes de quatro populações de *Rhodnius sp* (*R. neglectus*, *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. nasutus*). A origem, o habitat, as coordenadas geográficas e o número de asas de machos e fêmeas das populações de *Rhodnius* estudadas estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Origem, habitat, coordenadas geográficas e número de asas de machos e fêmeas das populações de *Rhodnius* estudadas por morfometria geométrica.

Populações	Origem	Coordenadas	Nº. Machos	Nº. Fêmeas	Habitat
<i>R. neglectus</i> ¹	Brasília, DF, Brasil	15°55'S, 47°54'W	20	20	Laboratório
<i>R. prolixus</i> ¹	Ibague, Tolima, Colômbia	2°59'N, 74°29'W	20	20	Laboratório
<i>R. robustus</i> ²	Benfica, Pará, Brasil	5°16'S, 49°50'W	20	20	Palmeiras (<i>Attalea speciosa</i>)
<i>R. nasutus</i> ²	Curaçá, BA, Brasil	8°59'S, 39°54'W	14	11	Palmeiras (<i>Copernicia cerifera</i>)

1. Colônias estabelecidas há mais de 2 anos em laboratório; 2. Geração 1 misturada com Geração 2.

Primeiramente os triatomíneos foram separados por espécie e por sexo e depois as asas (hemiélitros) foram dissecadas e montadas entre lâmina e lamínula com resina (Entellan[®]). Sete pontos de referência das asas de cada inseto foram tomados por captura de imagem digital usando um scanner de mesa com resolução de 1200 dpi e cor escala de cinza (Figura 4). Para cada indivíduo as asas esquerdas foram refletidas para também serem utilizadas na análise. Destes pontos, cinco foram considerados marcos anatômicos do tipo 1 (inserção de veias das asas) e dois marcos anatômicos do tipo 2 (extremidade da asa) segundo a classificação de Bookstein (1990). A análise morfométrica incluindo variação de tamanho e forma foi realizada de acordo com a orientação de Gurgel-Gonçalves, 2006 (comunicação pessoal) e com os softwares adequados para interpretação, o programa *tpsDig* (Rohlf, 1999a) e o programa *tpsRegr* (Rohlf, 1999b).

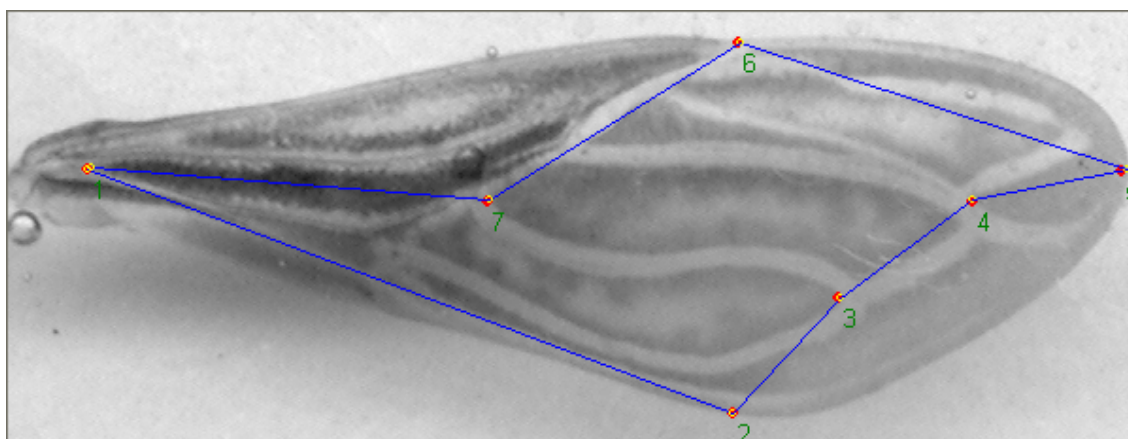


Figura 4. Asa direita de *Rhodnius neglectus* com os sete pontos de referência usados nas análises morfométricas.

3.2.1 Análise estatística

As diferenças de tamanho entre espécies e sexos foram ilustradas por diagramas de caixas e a significância das comparações foi testada por análises de variância (ANOVA) e Teste t.

3.3 Métodos para o desenvolvimento das colônias de insetos

Inicialmente foram selecionadas aleatoriamente 60 ninfas de quinto estágio (30 ninfas de *R. neglectus* e 30 ninfas de *R. robustus*), para obtenção de adultos virgens. Após a muda, foram formados 3 grupos compostos de 4 fêmeas e 3 machos, para cada espécie.

Os casais de cada espécie foram mantidos em conjunto para a obtenção de ovos em recipientes de plástico (9,5 cm de altura x 5,5 cm de diâmetro), com tampas com uma abertura de 4,5 cm de diâmetro forrado com uma malha de arame.

Os recipientes de plástico tinham o fundo forrado com papel filtro e contendo tiras do mesmo papel, dobradas em sanfona, para aumentar a superfície de contato e para absorver a umidade (Rocha *et al*, 1997).

Após a postura, 80 ovos foram agrupados pela data de oviposição para determinar o período de eclosão (embrionamento). Após a eclosão, as ninfas de primeiro estágio foram separadas individualmente em outros recipientes para as posteriores ecdises.

As observações foram conduzidas sob condições controladas de temperatura ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($75\% \pm 10\%$).

A fim de documentar o comportamento dos insetos “uma arena experimental” foi preparada, consistente em uma cuba de vidro transparente de 30 cm de diâmetro. No interior de cada um desses recipientes colocávamos, individualmente um camundongo albino (*Swiss* 44, macho, com 30 dias de nascido) que foram imobilizados com a ajuda de uma malha de arame (9cm de largura x 10cm de comprimento) (Rocha *et al*, 1997). Frente a esse hospedeiro foi colocado um espécime, para o registro dos padrões de alimentação e defecação. Todas as observações foram acompanhadas e cronometradas pela autora por um período de até uma hora.

3.4 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos

O número de ovos produzidos está diretamente relacionado à quantidade de sangue ingerido (Buxton, 1930; Friend *et al.*, 1965; Regis, 1979). Por isso, na fase inicial, os insetos adultos dos seis grupos compostos formados, foram alimentados duas vezes por semana para aumentar a produção de ovos.

Os insetos foram observados diariamente a fim de determinar *os percentuais de mortalidade, o período de embrionamento dos ovos e o período total de evolução das espécies em condições de laboratório.*

A alimentação foi oferecida, aproximadamente, 7 dias após a cada ecdise e o tempo de oferecimento da fonte sanguínea foi de no máximo 35 minutos. Somente aqueles exemplares que se recusavam a sugar ou sugavam pouca quantidade de sangue eram submetidos à nova tentativa de alimentação.

3.5 Alguns aspectos de comportamento alimentar experimental

Para ambas as espécies foram estudadas as seguintes variáveis relacionadas com a caracterização das duas espécies em seu papel como transmissoras de *T. rangeli*, através da observação direta por parte da autora e registro do tempo:

a) Tempo de aproximação: Tempo (em minutos) desde que o inseto foi colocado na vasilha até o momento de introdução da probóscide na pele do camundongo ("probing");

b) Número de picadas: Foi registrado o número de vezes que o inseto encostou e introduziu a probóscide na tentativa de encontrar vênulas/arteríolas na pele do camundongo, antes do início evidente do seu repasto;

c) Tempo do repasto: Tempo em minutos entre a primeira picada e o fim da ingestão de sangue;

d) Índice de picadas: Calculado dividindo-se o número de picadas pelo tempo do repasto, resultando no número de picadas por minuto (Botto-Mahan *et al.*, 2006). Os dados foram transformados utilizando Escala Logarítmica para a normalização dos dados e esses foram submetidos a uma Análise de Variância, tendo como fatores espécie e estágio ninfal;

e) Número de interrupções: Contabilizou-se o número de interrupções espontâneas do inseto, após a verificação do início do repasto;

f) Lapso entre o final do repasto e a primeira defecação: Este intervalo de tempo também foi registrado (em minutos);

g) Defecação: Verificou-se o número de defecações por inseto durante e até 10 minutos após o repasto por observação direta do inseto;

h) Quantidade de sangue ingerido em cada estágio ninfal: Todos os insetos foram pesados antes e imediatamente após o repasto em balança analítica AND HR-200, graduada em mg para designar a quantidade de sangue ingerido.

Para a análise estatística dos resultados, primeiramente foi utilizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a normalidade. Para os parâmetros com distribuição normal, utilizou-se o Teste t, e para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o Teste de Mann-Whitney.

3.6 Estudo anatômico e histológico das glândulas salivares

Para este estudo utilizamos exemplares de *R. robustus*, adultos e de ambos os sexos e foi utilizada somente a glândula D1, pelo fato da glândula D2 ser mais frágil, dificultando assim a sua extração.

Primeiramente, o exemplar foi narcotizado com éter, cortou-se os bordos laterais dos esternitos, aprofundando até à região cervical. Fixou-se o exemplar, em uma placa de Petri forrada com uma camada de parafina. A seguir retirou-se os tergitos expondo as glândulas salivares, parte do aparelho digestivo, o vaso dorsal, o corpo gorduroso, o sistema traqueal e a musculatura. Após a exposição das glândulas instilou-se solução salina para não provocar o ressecamento.

Os exemplares utilizados estavam de jejum prolongado (aproximadamente 30 dias), para não dificultar o encontro das glândulas pela presença do repasto sanguíneo.

Após a exposição das glândulas, fotos digitais (Coolpix 5700, 5.0Mpx da Nikon) foram tiradas para documentar as características morfológicas das glândulas salivares dos *R. robustus*.

Para o estudo histológico, as glândulas salivares foram extraídas, colocadas em formol a 10% e levadas ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina para o processamento, onde foram feitos cortes histológicos de 5 µm, com coloração H.E. (Hematoxilina – eosina).

3.7 Suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao *T. rangeli*

A suscetibilidade das duas diferentes espécies de *Rhodnius* para *T. rangeli* foi avaliada usando-se camundongos, que foram inoculados por via intraperitoneal com altas concentrações (5×10^7 flagelados/ml) dos isolados brasileiros de *T. rangeli* (Figura 5), a cepa SC-58 (Grisard *et al.*, 1999) e a cepa LP-01, isolada recentemente de *R. neglectus* naturalmente infectado, procedente de Ituiutaba – MG (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2006a).



Figura 5. Formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* da cultura SC-58 (100x). A. Epimastigota; B. Tripomastigota.

Vinte e quatro horas após a inoculação, uma amostra de sangue foi retirada através de um corte na cauda do camundongo e foi analisada para verificar a positividade da infecção. Como houve negatividade para SC-58, novas amostras foram coletadas a cada 48 horas após a inoculação.

Também foi realizada uma inoculação intracelômica nos insetos, onde uma certa quantidade da cultura da cepa SC-58, foi injetada diretamente na parte torácica dorsal abaixo da asa do inseto (D'Alessandro & Saravia, 1992).

Xenodiagnósticos artificiais foram realizados com 30 espécimes de *R. neglectus* e 20 espécimes de *R. robustus*, que formaram os grupos experimentais, A e B. Para isso, foram selecionadas ninfas de IV e V estádios.

Para o xenodiagnóstico artificial, 3 ml da cultura da cepa SC-58 foram adicionados a 5 ml de sangue humano em um tubo com heparina. O sangue infectante foi levado ao Laboratório de Doença de Chagas no Núcleo de Medicina Tropical, onde foi primeiramente colocado em banho-maria para atingir a temperatura corporal (36,5°C). Depois foi levado ao aparelho de Xenodiagnóstico Artificial, onde as ninfas foram colocadas para a realização do repasto sanguíneo infectante. Ao término do procedimento, cada inseto foi colocado individualmente em um recipiente apropriado e identificado.

Os insetos foram observados diariamente para verificar a taxa de mortalidade, estabelecendo assim o grau patogênico do *T. rangeli* sobre os triatomíneos.

Depois de sete dias do repasto infectante, os conteúdos intestinais foram examinados microscopicamente. Como houve negatividade, novas amostras foram coletadas com 15 dias após o repasto infectante. Após a comprovação da infecção intestinal, amostras hemolinfáticas foram coletadas para comprovar a invasão da hemolinfa.

Com a cepa LP-01, foi realizada uma inoculação intraperitoneal em camundongos de laboratório. Vinte e quatro horas após a inoculação, uma amostra de sangue foi retirada através de um corte na cauda do camundongo e foi analisada para verificar a positividade da infecção.

3.8 Infecção *in vitro* das glândulas salivares

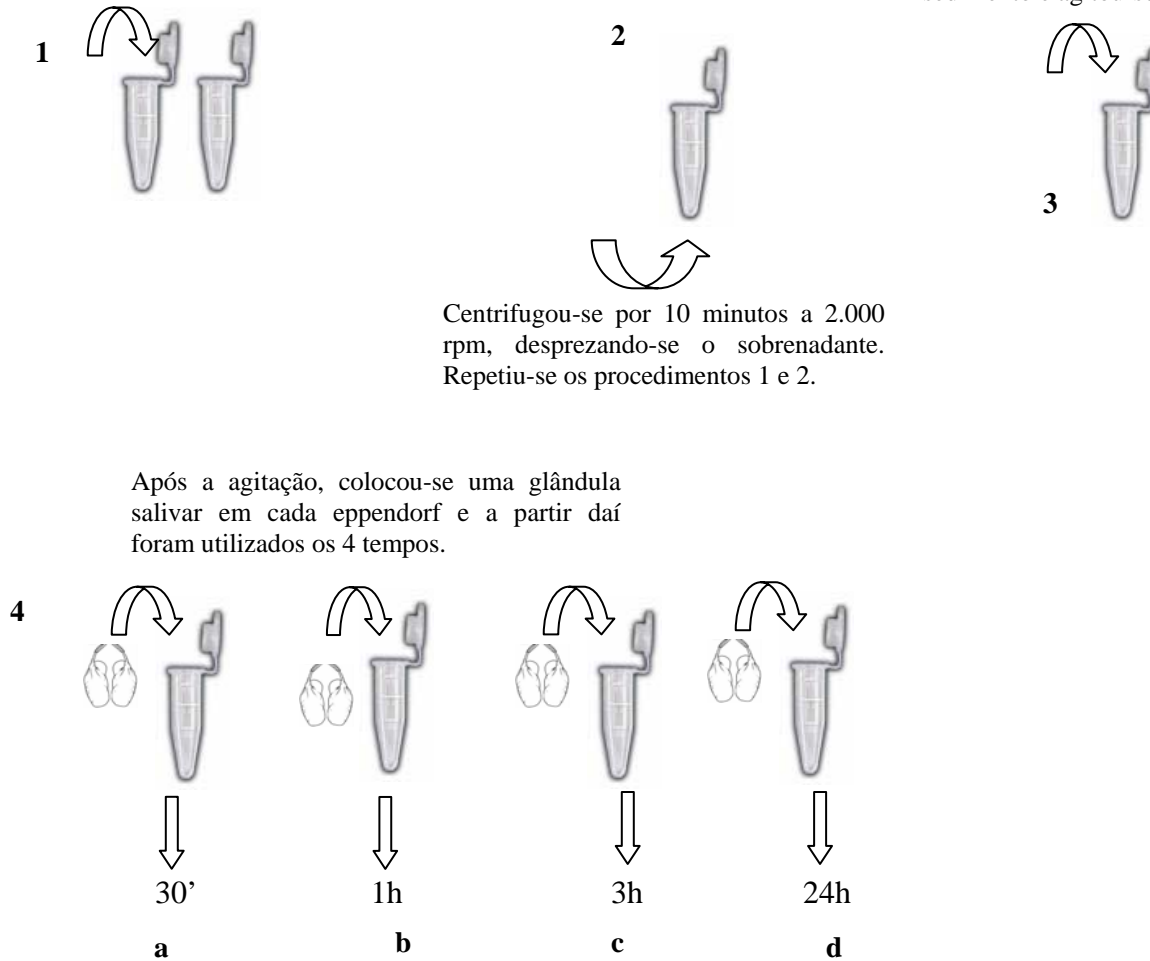
Baseando-se em De Oliveira & De Souza (2001) que aplicaram o modelo de estudo para intestino de *R. prolixus*, utilizamos um método modificado para o estudo da infecção *in vitro* das glândulas salivares através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Primeiramente 20 adultos de *R. robustus* foram mantidos em jejum por um período de um mês, para a remoção das glândulas salivares. Para o controle, uma glândula salivar foi extraída e colocada diretamente no fixador para o processamento.

Uma cultura da cepa SC-58 foi incubada por 14 dias em Agar sangue, até apresentar altas concentrações de tripomastigotas/epimastigotas. O protocolo usado para a infecção experimental das glândulas salivares está ilustrado na Figura 6.

Colocou-se em 8 eppendorfs 500 μ l da cultura + 1.000 μ l de PBS

Acrescentou-se 500 μ l de tampão (200 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃, pH 6.8) no sedimento e agitou-se



Centrifugou-se por 10 minutos a 2.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Repetiu-se os procedimentos 1 e 2.

Após a agitação, colocou-se uma glândula salivar em cada eppendorf e a partir daí foram utilizados os 4 tempos.

Figura 6. Protocolo utilizado para a infecção experimental "*in vitro*" das glândulas salivares.

Após o término dos 4 tempos (a, b, c e d), as glândulas salivares foram processadas para a Microscopia Eletrônica de Varredura:

1. Ao final de cada tempo o sobrenadante foi retirado e foi colocado 150 μ l do fixador (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% de sacarose);
2. O fixador foi retirado e foram feitas 4 lavagens de 15 minutos com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2;
3. O tampão foi retirado e colocou-se 2 gotas de ferricianeto de potássio e 2 gotas de tetróxido de ósmio;
4. Após a inoculação por 1 hora, lavou-se as amostras 3 vezes com água destilada;

5. Iniciou-se o processo de desidratação com acetona 30%, 50%, 70% e 90% por 15 minutos cada uma, e 3 lavagens com acetona 100% por 10 minutos cada uma;
6. As amostras foram colocadas num suporte e levadas ao aparelho de secagem ao ponto crítico da Balzers CPD 30;
7. Após a secagem, as amostras foram presas em stubs e levadas ao aparelho Sputter Coater, Balzers SCD 050, para metalização.

Após a metalização, as amostras foram levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JEM 840A (x13 – x3.000) para o registro das infecções.

Para a Microscopia Óptica, foram utilizados 2 eppendorfs com 500 µl de cultura e seguiu-se os passos do 1 ao 3 do protocolo utilizado para a infecção. Uma glândula foi extraída, colocada numa lâmina escavada e acrescentou-se 0,03 ml de cultura. Registrou-se a infecção durante os quatro tempos.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação dos espécimes de *Rhodnius*

Comprovou-se através da utilização das chaves descritas por Lent & Wygodzinsky (1979) tratar-se das espécies *R. neglectus* e *R. robustus*. Essa identificação foi confirmada através das técnicas de morfometria geométrica de asas, conforme resultado abaixo.

O dimorfismo sexual foi observado nas análises de variação de tamanho: asas das fêmeas foram significativamente maiores que as dos machos. Analisando as populações separadamente por sexo foi observado que as asas menores pertenceram as espécies de *R. nasutus* e *R. neglectus* e as maiores a *R. robustus* e *R. prolixus*. As menores asas pertenceram aos machos de *R. neglectus* ($\bar{x} = 0,57 \pm 0,015$) e as maiores pertenceram às fêmeas de *R. robustus* ($\bar{x} = 0,69 \pm 0,020$), sendo significativamente diferentes ($p < 0,001$) (Figura 7).

Essas diferenças foram mais significativas para asas de machos (ANOVA, $F=168,8$; $p < 0,001$) que de fêmeas (ANOVA, $F=58,9$; $p < 0,001$).

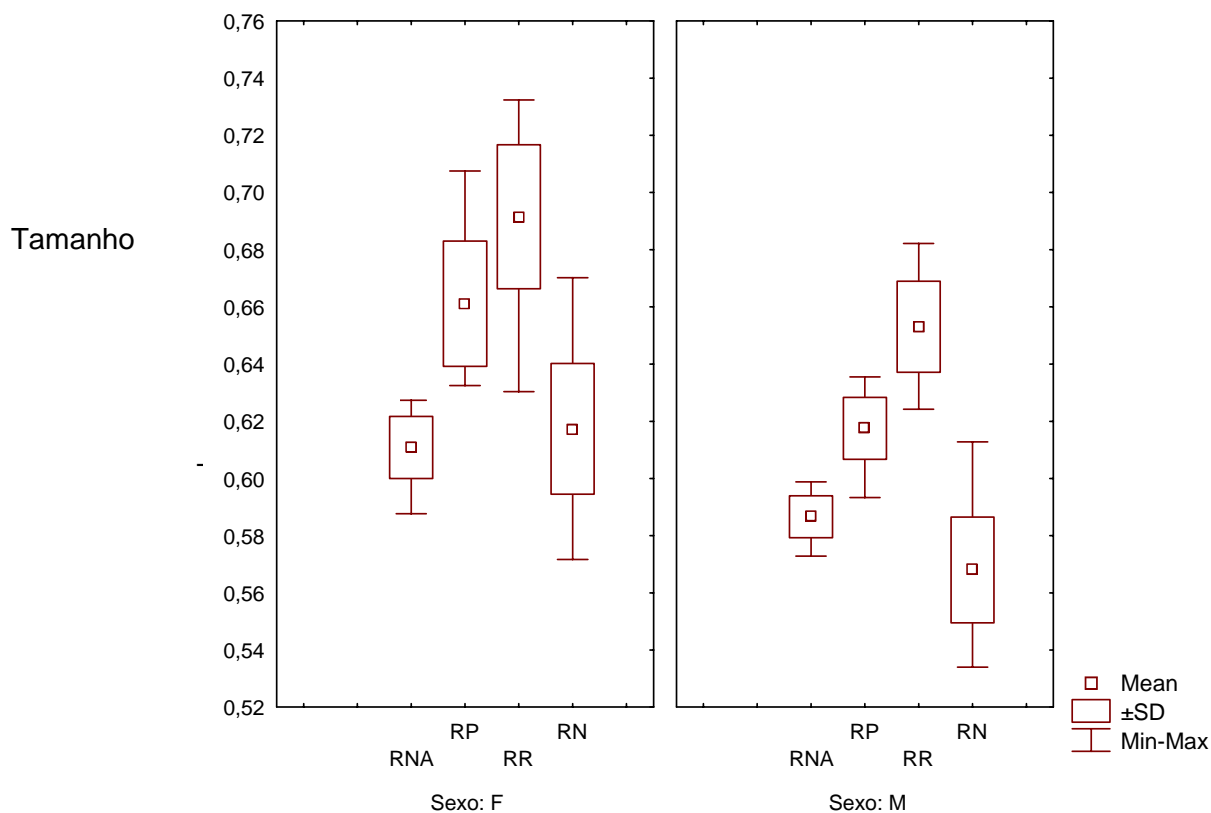


Figura 7. Variação do tamanho da asa entre populações e sexos de espécies de *Rhodnius*. Cada caixa mostra a média, o desvio padrão e o mínimo e máximo para cada população. Legenda: RNA (*R. nasutus*), RN (*R. neglectus*), RP (*R. prolixus*) e RR (*R. robustus*).

Analisando as asas dos machos, os resultados da morfometria geométrica de asas de *Rhodnius* mostram que é possível diferenciar as espécies, formando dois agrupamentos morfológicos: um formado por (*R.neglectus* + *R.nasutus*) e outro por (*R.robustus* + *R.prolixus*), permitindo dessa forma a diferenciação entre os espécimes de *R. neglectus* e *R. robustus* usados no presente estudo (Figura 8).

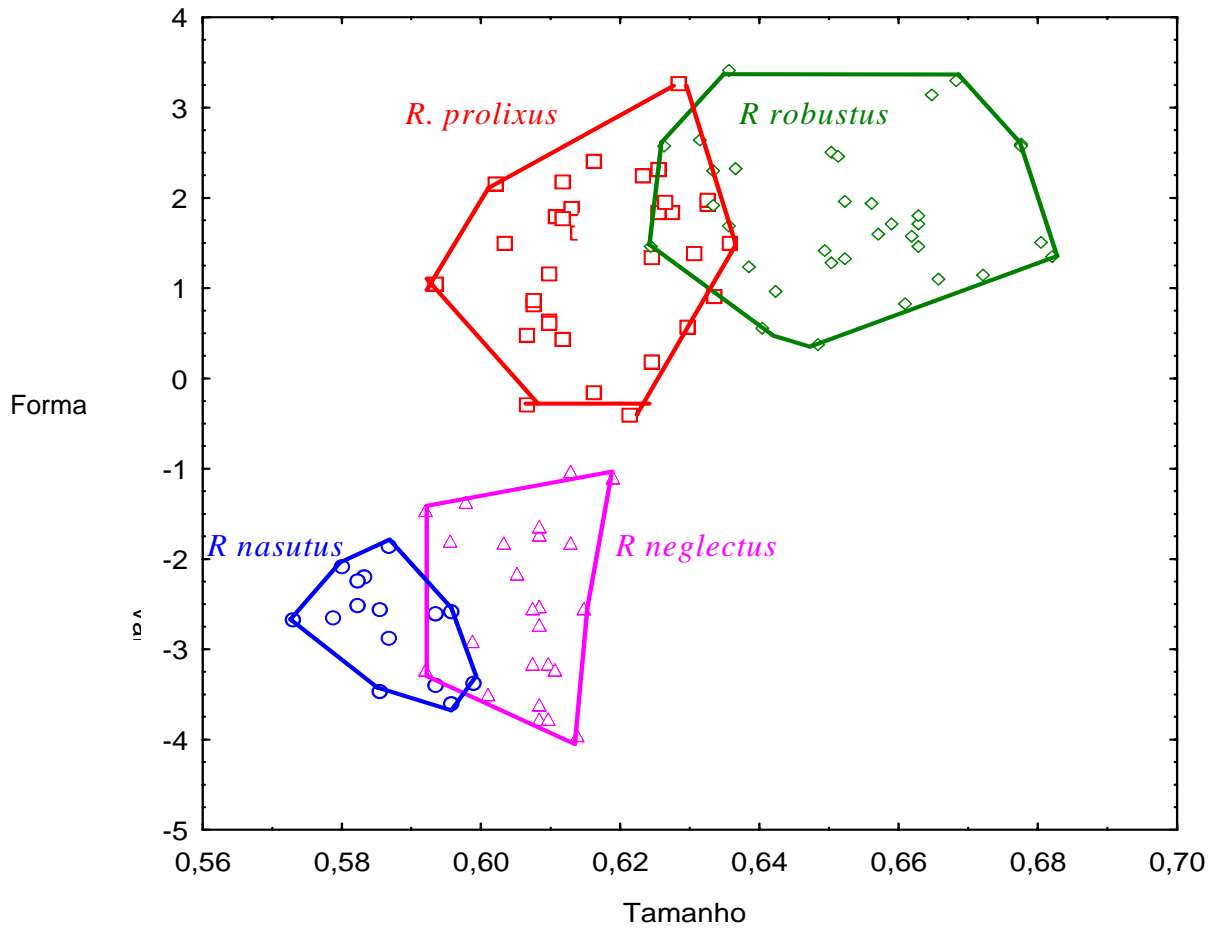


Figura 8. Mapa fatorial mostrando a variação de tamanho e forma para machos de populações de *Rhodnius*. Os polígonos correspondem às diferentes populações estudadas.

4.2 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos

Como os ovos não embrionados foram substituídos, dos 80 espécimes de *R. neglectus*, 31 (38,8%) atingiram a fase adulta (Tabela 3). Da Ninfa I à Ninfa III, os insetos necessitaram, em média, de menos de um mês para alcançarem o estágio seguinte. As médias obtidas estão distribuídas de forma crescente de acordo com a muda ninfal até o estágio adulto. Os percentuais de mortalidade variaram em relação aos estádios de desenvolvimento. Os maiores percentuais de mortalidade foram registrados para as Ninfas I e II. As Ninfas IV e V apresentaram quase o mesmo percentual.

Tabela 3: Período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio de *R. neglectus* e percentual de mortalidade por fase de desenvolvimento.

Estádio	N	Mín.	Máx.	Duração (X ± S dias)	Mortalidade (%)
Ovo	80	7	15	12,9 ± 1,70	---*
I	80	11	38	18,6 ± 6,75	33,0
II	54	14	41	22,5 ± 5,90	26,0
III	40	16	47	24,4 ± 9,11	17,5
IV	33	18	47	30,8 ± 8,59	6,1
V	31	22	88	45,4 ± 18,24	6,5
Período Ninfal	---	86	199	156,4 ± 25,05	63,8

N: número de insetos; X: média; S: desvio padrão; I: 1° estágio; II: 2° estágio; III: 3° estágio; IV: 4° estágio; V: 5° estágio.

* Os ovos não embrionados foram descartados e substituídos.

Dos 80 espécimes de *R. robustus*, 38 (47,5%) chegaram à fase adulta (Tabela 4). Se comparado com *R. neglectus*, o período de desenvolvimento foi maior em todos os estágios. Apenas as Ninfas I e II, levaram em média, menos de um mês para atingir o estágio seguinte. Os percentuais de mortalidade também tiveram uma variação diferente de *R. neglectus*, onde os maiores percentuais pertenceram às Ninfas I e V.

Tabela 4: Período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio de *R. robustus* e percentual de mortalidade por fase de desenvolvimento.

Estádio	N	Mín.	Máx.	Duração (X ± S dias)	Mortalidade (%)
Ovo	80	14	23	17,5 ± 1,57	---*
I	80	18	48	23,4 ± 4,92	33,8
II	53	23	45	28,5 ± 4,83	7,5
III	49	32	53	40,7 ± 5,85	14,3
IV	42	30	63	46,3 ± 11,06	9,5
V	38	32	59	47,2 ± 8,92	26,3
Período Ninfal	---	182	228	204,7 ± 13,22	65,0

N: número de insetos; X: média; S: desvio padrão; I: 1° estágio; II: 2° estágio; III: 3° estágio; IV: 4° estágio; V: 5° estágio. * Os ovos não embrionados foram descartados e substituídos.

A Tabela 5 mostra comparativamente o período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio, das duas espécies utilizadas. Nota-se que o período foi muito maior para *R. robustus*, sendo que apresentaram quase o mesmo tempo no período de embrionamento e na muda do 2º para o 3º estágio e na última muda. Houve diferença significativa ($p < 0,001$) para todos os estágios, exceto para as Ninfas V.

Tabela 5: Período de desenvolvimento (em dias) de cada estágio de *R. neglectus* e *R. robustus*.

Estádio	Duração <i>R. neglectus</i> (X ± S dias)	Duração <i>R. robustus</i> (X ± S dias)
Ovo	12,9 ± 1,70	17,5 ± 1,57
I	18,6 ± 6,75	23,4 ± 4,92
II	22,5 ± 5,90	28,5 ± 4,83
III	24,4 ± 9,11	40,7 ± 5,85
IV	30,8 ± 8,59	46,3 ± 11,06
V	45,4 ± 18,24	47,2 ± 8,92
Período Ninfal	156,4 ± 25,05	204,7 ± 13,22

X: média; S: desvio padrão; I: 1º estágio; II: 2º estágio; III: 3º estágio; IV: 4º estágio; V: 5º estágio.

4.3 Comportamento alimentar em relação à transmissão do *T. rangeli*

4.3.1 Tempo de aproximação dos insetos à fonte alimentar – Para *R. neglectus*, o tempo aumentou de acordo com a mudança de estágio, sendo que na fase adulta o tempo foi de quase 50% a menos que na Ninfa V, mas não houve diferença significativa entre as médias. Já as Ninfas III e os adultos apresentaram praticamente o mesmo tempo, 3,6 e 3,5 respectivamente (Figura 9). A ninfa I foi a única que apresentou diferença significativa com relação à todas as outras médias ($p < 0,001$).

Para *R. robustus*, as variações foram muito parecidas, até na fase adulta também ocorreu uma redução de quase 50% se comparado à Ninfa V, e nessa espécie houve diferença significativa ($p < 0,05$). A Ninfa I também apresentou diferença significativa, com relação às Ninfas III, IV e V ($p < 0,05$).

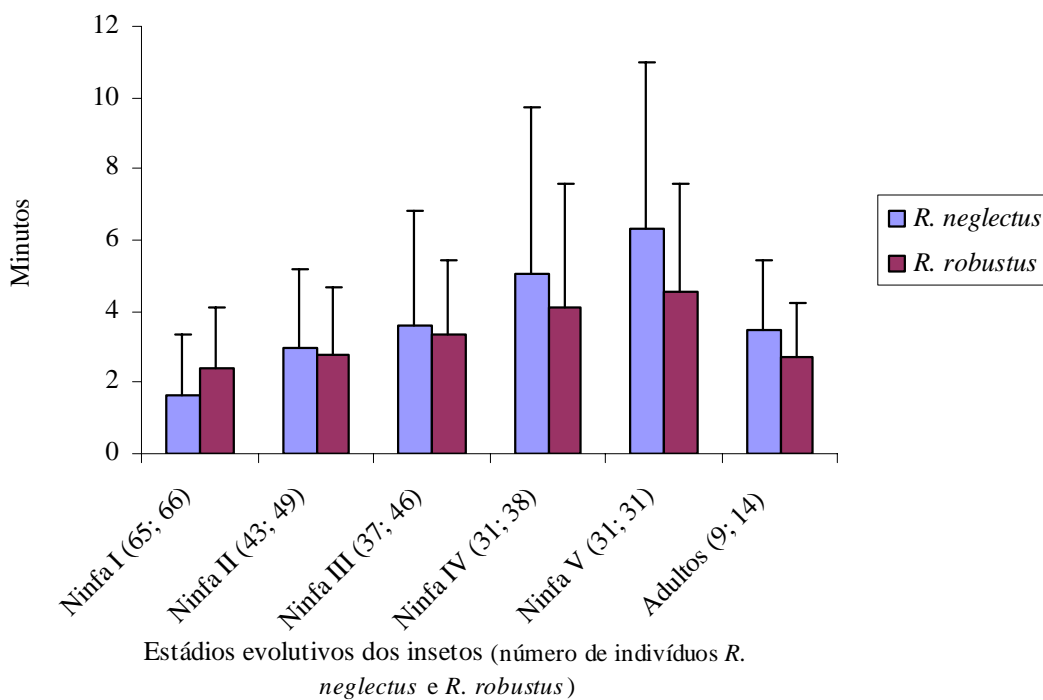


Figura 9. Valor médio do tempo de aproximação dos *R. neglectus* e *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão da média.

4.3.2 Número de picadas – O número de picadas foi variável. Tanto para *R. neglectus* quanto para *R. robustus*, as Ninfas I foram as que apresentaram o maior número de picadas ($\bar{x} = 7,4$ e $\bar{x} = 5,6$), seguido da Ninfa II ($\bar{x} = 4,3$ e $\bar{x} = 3,4$). Mas as Ninfas III, IV e V apresentaram praticamente o mesmo número de picadas, com uma média de 4 picadas para *R. neglectus* e 3 picadas para *R. robustus*. O que apresentou menor número de picadas até o início do repasto foram os triatomíneos da fase adulta (Figura 10). As Ninfas I e os insetos adultos das duas espécies apresentaram diferença significativa com todas as outras médias ($p < 0,001$).

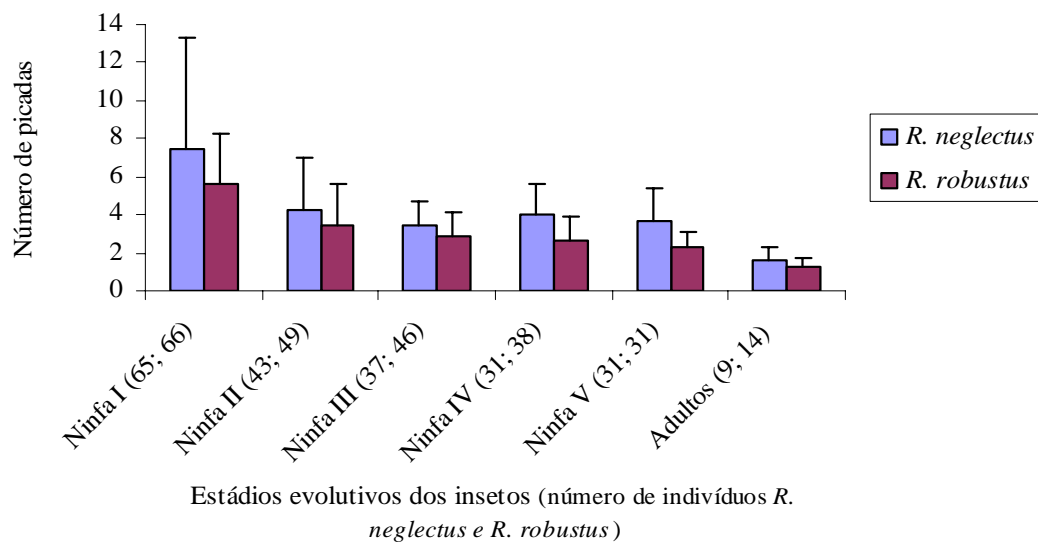


Figura 10. Valor médio do número de picadas de *R. neglectus* e *R. robustus* na fonte alimentar. As barras representam o desvio padrão das médias.

4.3.3 Tempo do repasto sanguíneo – O valor médio foi similar para as duas espécies estudadas, mas não apresentaram diferença estatística ($p > 0,001$). A duração do repasto aumentou com a aproximação da fase adulta, mas as Ninfas V foram as que apresentaram a maior média. Na fase adulta ocorreu uma redução no período de repasto (Figura 11).

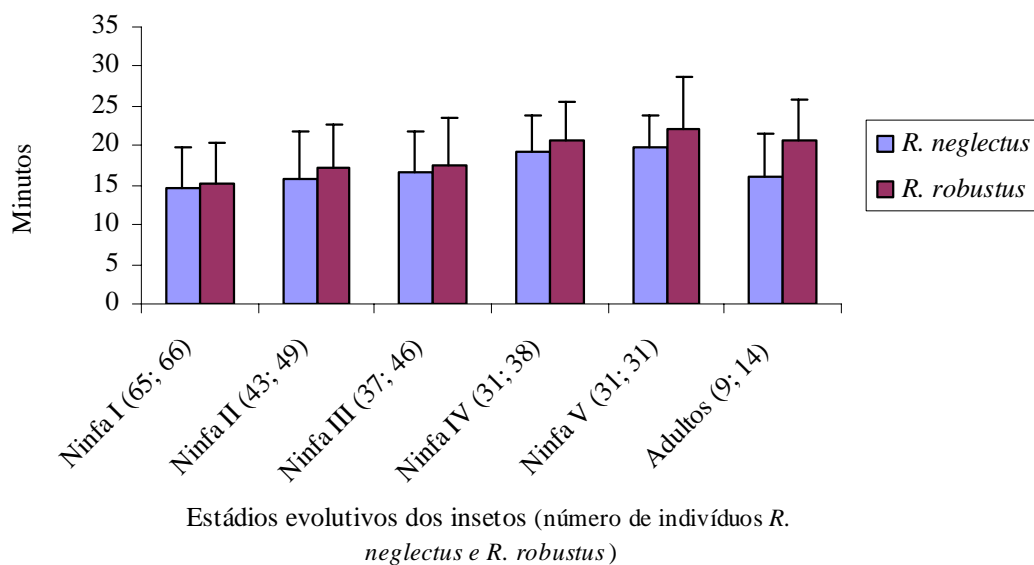


Figura 11. Valor médio do tempo total do repasto sanguíneo para *R. neglectus* e para *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão das médias.

4.3.4 Índice de picadas – Comparando-se a média geral das duas espécies, o índice de picadas é 60% maior para *R. neglectus* ($0,35 \pm 0,03$, $N = 216$). *R. robustus* apresentou uma média de $0,22 \pm 0,01$, $N = 244$. Para as duas espécies, a Ninfa I apresentou o maior índice de picadas por minuto, e esse parâmetro diminuiu com o desenvolvimento do inseto, atingindo na fase adulta o menor índice (Figura 12).

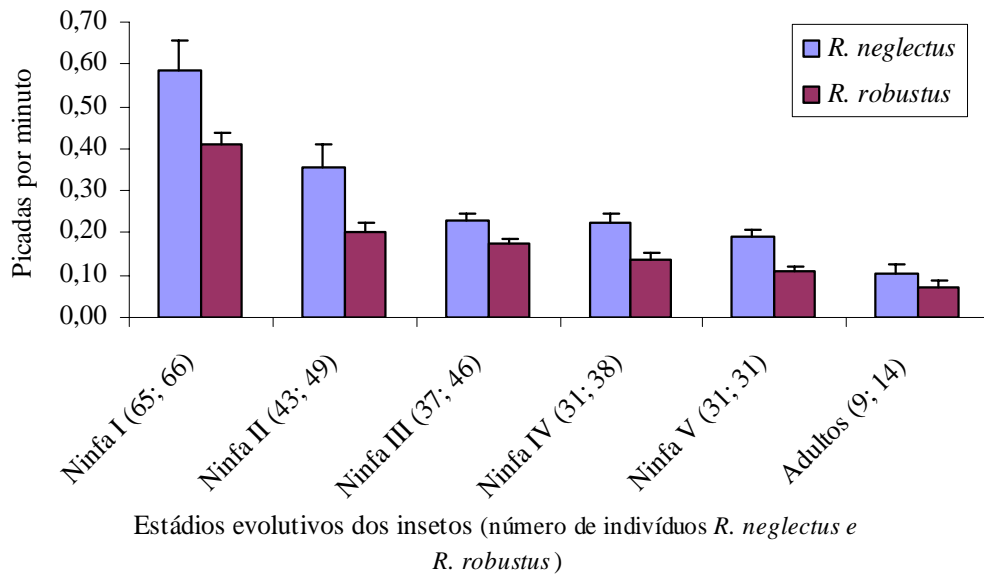


Figura 12. Índice de picadas para *R. neglectus* e para *R. robustus*. As barras representam o erro padrão.

4.3.5 Número de interrupções – Em *R. neglectus*, o número de interrupções foi maior para as Ninfas I com a média de 2,3 interrupções por repasto (Figura 13). As Ninfas IV e V apresentaram a mesma média de interrupções (1,33).

Em *R. robustus*, o número de interrupções foi muito parecido para as Ninfas I, II e IV, com a média de 2 a 3 interrupções por repasto.

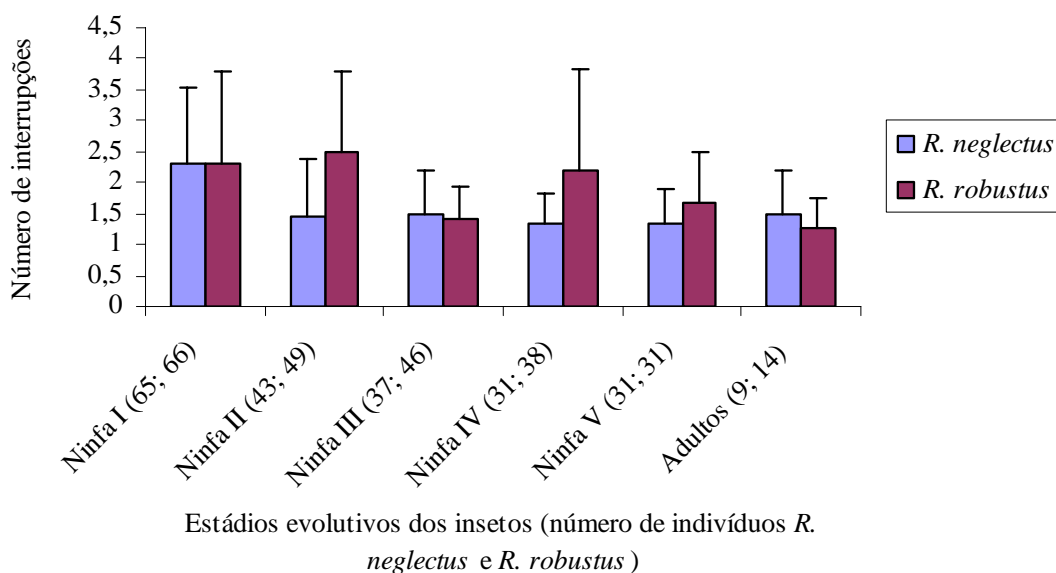


Figura 13. Valor médio do número de interrupções durante a alimentação por *R. neglectus* e por *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão.

4.3.6 Lapso entre o final do repasto e a primeira defecação – Para *R. neglectus* as Ninfas I não defecaram durante o período de 10 minutos, estabelecido para avaliar esse experimento. Os adultos apresentaram um tempo maior para a primeira defecação, em média 5 minutos, mas não houve diferença significativa entre a média dos adultos e dos outros estádios ninfais (Figura 14).

Para *R. robustus*, as Ninfas I apresentaram o maior tempo para a defecação (quase 8 minutos), e houve diferença significativa com as Ninfas II, III, IV e adultos ($p < 0,05$).

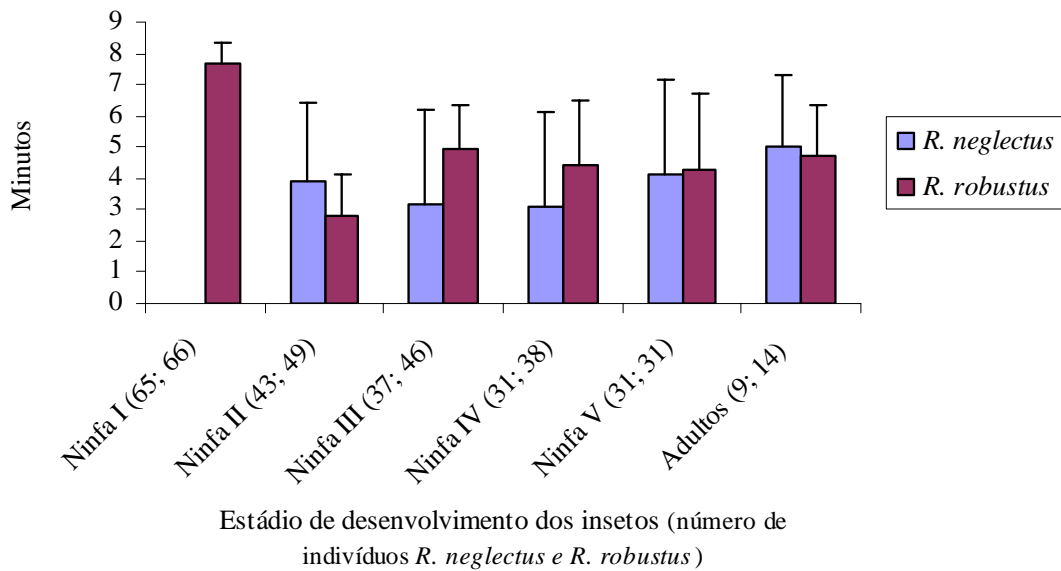


Figura 14. Valor médio do tempo entre o final do repasto até a primeira defecação dos *R. neglectus* e *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão das médias.

4.3.7 Defecação – Os percentuais de defecações observados durante todo o ciclo em um período de até 10 minutos após o término da alimentação foram variáveis. Tanto para *R. neglectus* e *R. robustus*, o maior percentual de defecações observadas em até 10 minutos, ocorreu com as Ninfas V, com uma média de 90% (Figura 15).

Para *R. neglectus*, o menor percentual foi registrado para as Ninfas II (35%), seguido dos adultos (44%). As Ninfas III e IV apresentaram aproximadamente a mesma média, 63 e 67% respectivamente.

Para *R. robustus*, o menor percentual foi registrado nas Ninfas I (3%), seguido em ordem crescente das Ninfas II (22%), III (41%), IV (53%) e adultos (60,8%).

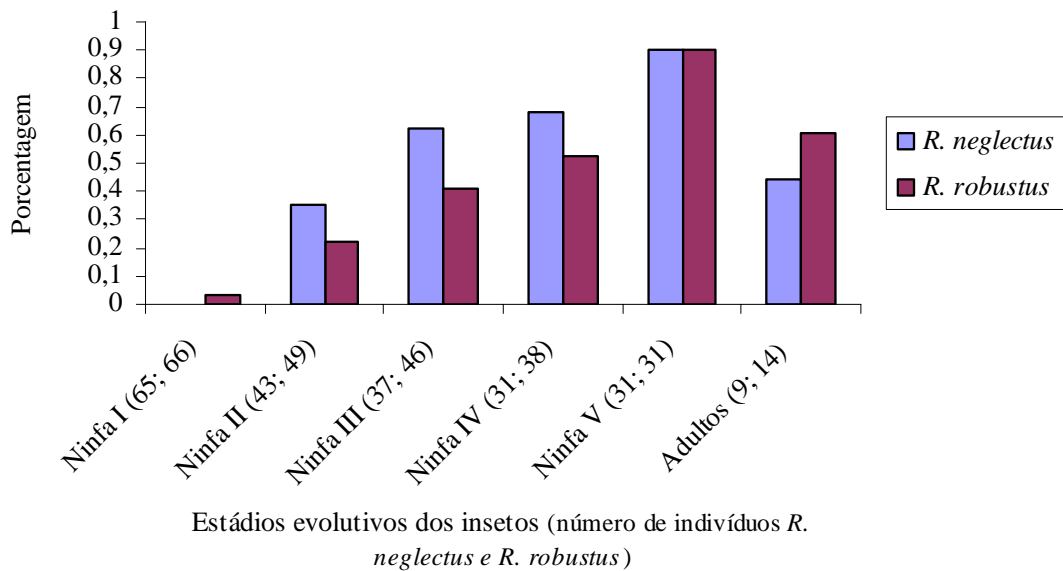


Figura 15. Percentuais de defecações para *R. neglectus* e para *R. robustus*, por estágio ninfal, somando as observações realizadas durante e após o repasto.

4.3.8 Quantidade de sangue ingerido em cada estágio ninfal – Para as duas espécies, a quantidade de sangue ingerido foi crescente com o decorrer do desenvolvimento dos insetos, alcançando o pico pelas Ninfas V. Houve uma diferença acentuada entre as médias das duas espécies ($p < 0,001$).

Para *R. neglectus*, na fase adulta houve um decréscimo na quantidade de sangue ingerido, com a diminuição de quase 50% do volume (Figura 16). Houve diferença significativa entre a quantidade de sangue ingerido por todos os estágios ninfais.

Para *R. robustus*, também houve um decréscimo na fase adulta, mas não houve diferença significativa entre a quantidade de sangue ingerida pelos dois últimos estágios ninfais.

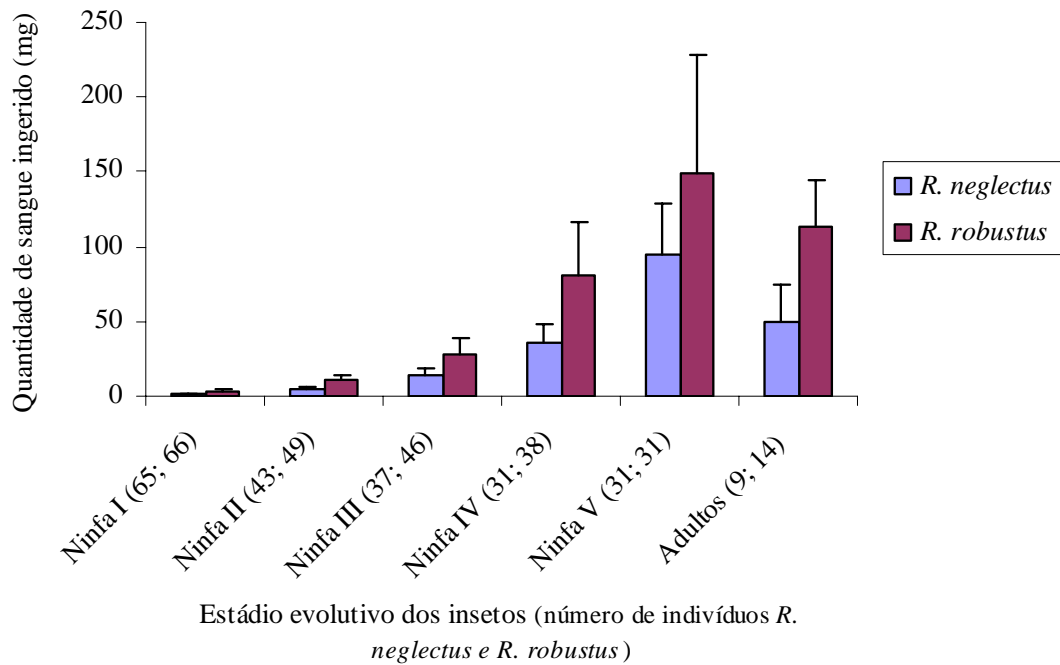


Figura 16. Valores médios (em mg) da quantidade de sangue ingerido por *R. neglectus* e por *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão das médias.

4.4 Estudo anatômico e histológico das glândulas salivares

Após a retirada dos tergitos e esternitos de *R. robustus*, foi possível observar com clareza os dois pares de glândulas, D1 e D2 (Figura 17). De forma geral, as glândulas são alongadas e de cor avermelhada, o que facilita a sua visualização. A coloração resulta da presença de uma proteína de pigmento vermelho presente nas glândulas do gênero *Rhodnius*.

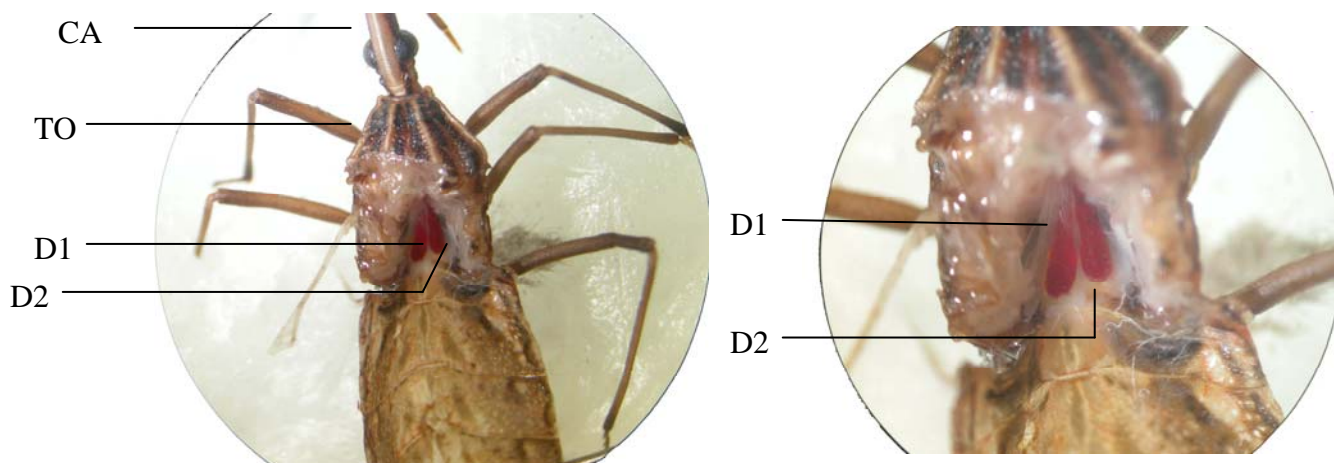


Figura 17. Vista interna das glândulas salivares de *Rhodnius robustus*. CA: cabeça; TO: tórax; D1 e D2: glândulas salivares.

Os cortes histológicos mostraram uma nítida vacuolização citoplasmática no corpo e nas extremidades e lúmen preenchido parcialmente com material granular, indicando vestígios de saliva (Figura 18).

A maioria de suas células são colunares com núcleo ovóide e cromatina finamente granular. Apresenta ducto com células colunares baixas com núcleo ovóide menor que as células secretoras e citoplasma claro (Figura 19).

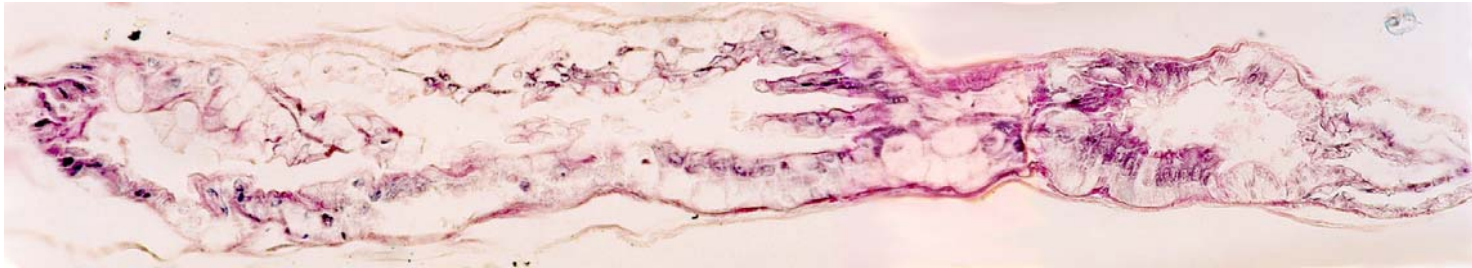


Figura 18. Corte histológico longitudinal pela glândula salivar D1 de *Rhodnius robustus* corado pelo H. E. (x100).

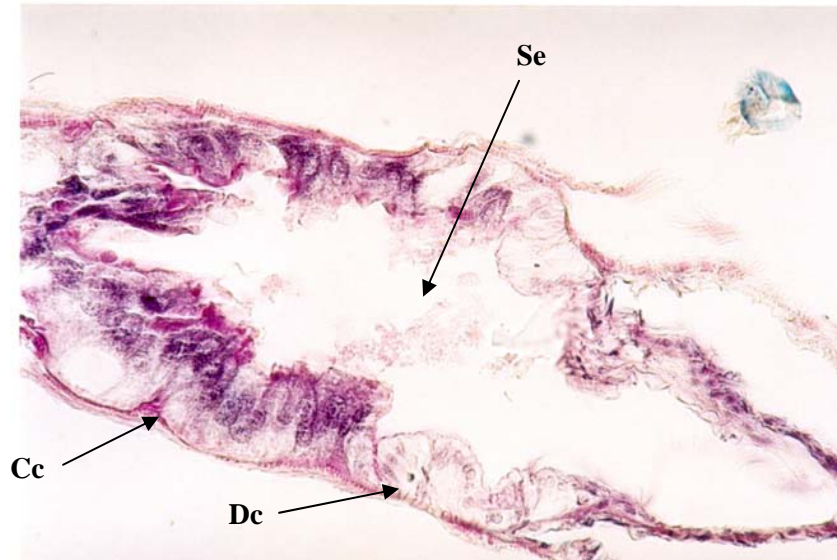


Figura 19. Detalhe da extremidade da glândula salivar D1 de *R. robustus*. Cc: células colunares; Dc: ducto Se: secreção (x400).

Observou-se também a presença de uma pequena zona com lúmen virtual, onde as células apresentam a sua máxima balonização. Duas estruturas papilares precedem essa zona, com eixo conjuntivo sem balonização citoplasmática (Figura 20).

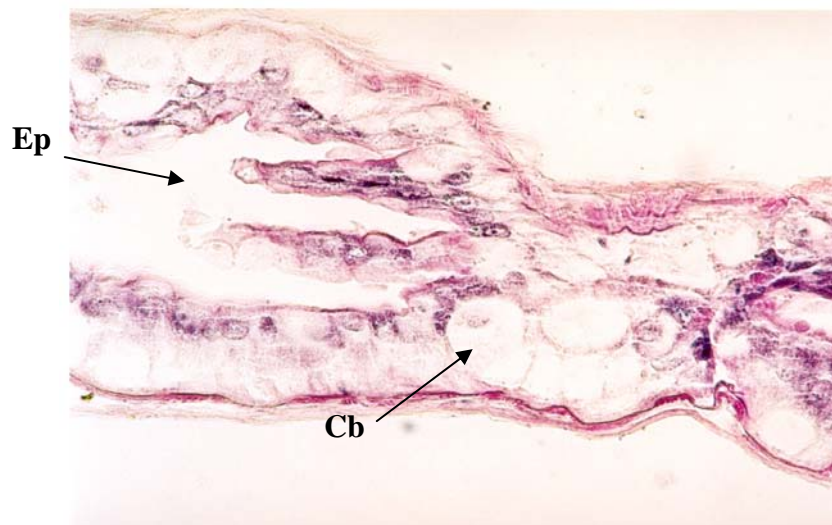


Figura 20. Detalhe da parte central da glândula salivar de *R. robustus*. Cb: células balonizadas no lúmen virtual; Ep: estruturas papilares (x400).

4.5 Suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao *T. rangeli*

Não houve positividade nas tentativas de inoculação intraperitoneal em camundongos e de inoculação intracelômica em insetos com a cepa SC-58.

Com a cepa LP-01, um camundongo apresentou formas tripomastigotas no sangue, 48 horas após a inoculação. Após a confirmação, foi realizado um xenodiagnóstico com 20 espécimes (Ninfa V) de *R. robustus*. Após 15 dias, eles foram examinados e 45% dos espécimes estavam infectados ao nível do intestino e amostras de hemolinfa foram recolhidas e examinadas. Não houve positividade da hemolinfa e não houve positividade intestinal nos outros espécimes. A maioria dos insetos não conseguiu emergir da exúvia e acabaram morrendo.

Três xenodiagnósticos artificiais com a cepa SC-58, foram realizados com *R. neglectus*, que foram examinados 15 dias após o processo e apresentaram 100% de infecção intestinal. Após a confirmação da positividade, amostras da hemolinfa foram recolhidas e

examinadas. Dos 90 insetos utilizados para o xenodiagnóstico, apenas 1 apresentou hemolinfa positiva, mas não houve infecção das glândulas salivares.

Com *R. robustus*, foi realizado um xenodiagnóstico artificial em 30 espécimes e com 15 dias observou-se 100% de infecção ao nível de intestino. Desses infectados, apenas 1 apresentou hemolinfa positiva, mas como rejeitou a alimentação acabou morrendo sem a progressão da infecção.

4.6 Infecção *in vitro* das glândulas salivares

Após o preparo, as amostras foram levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura, e imagens foram obtidas para verificar o processo inicial de penetração do *T. rangeli* em glândulas salivares.

A glândula salivar utilizada como controle, apresentou a maior parte da lâmina basal lisa, com pequenos enrugamentos visíveis e com pequenas fissuras (Figura 21).

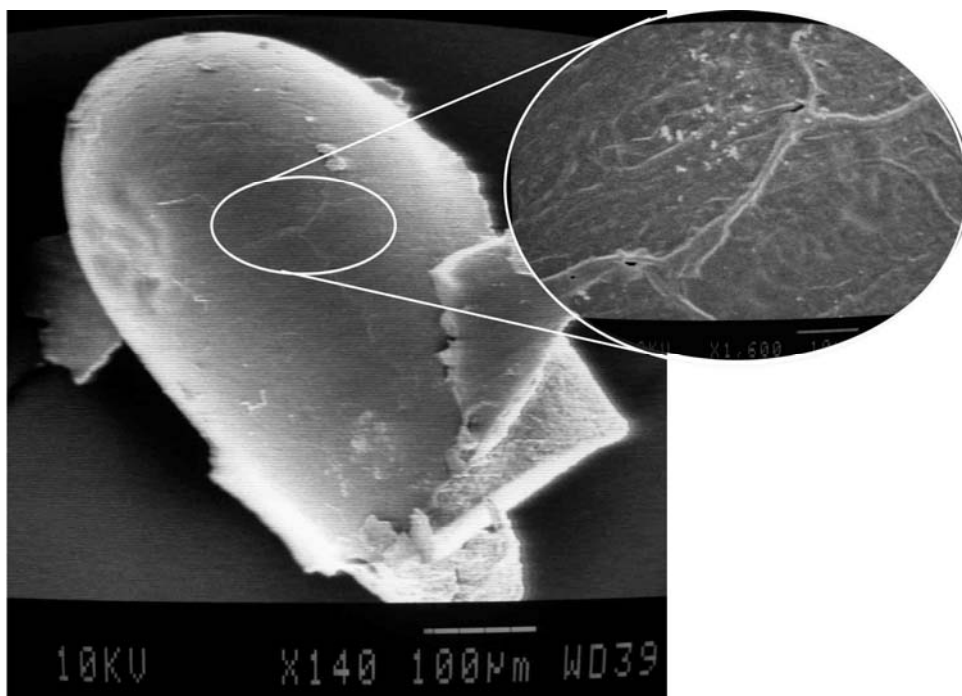


Figura 21. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da glândula salivar não infectada de *R. robustus* (x140). Em destaque, pequenas fissuras na lâmina basal (x1.600).

Com 30 minutos de infecção, a glândula apresentou na área próxima ao ducto, um acúmulo de flagelados aderidos pelo flagelo (A). Verificou-se também a presença de um grupo de flagelados "aparentemente penetrando" por uma fenda na lâmina basal (B) (Figura 22).

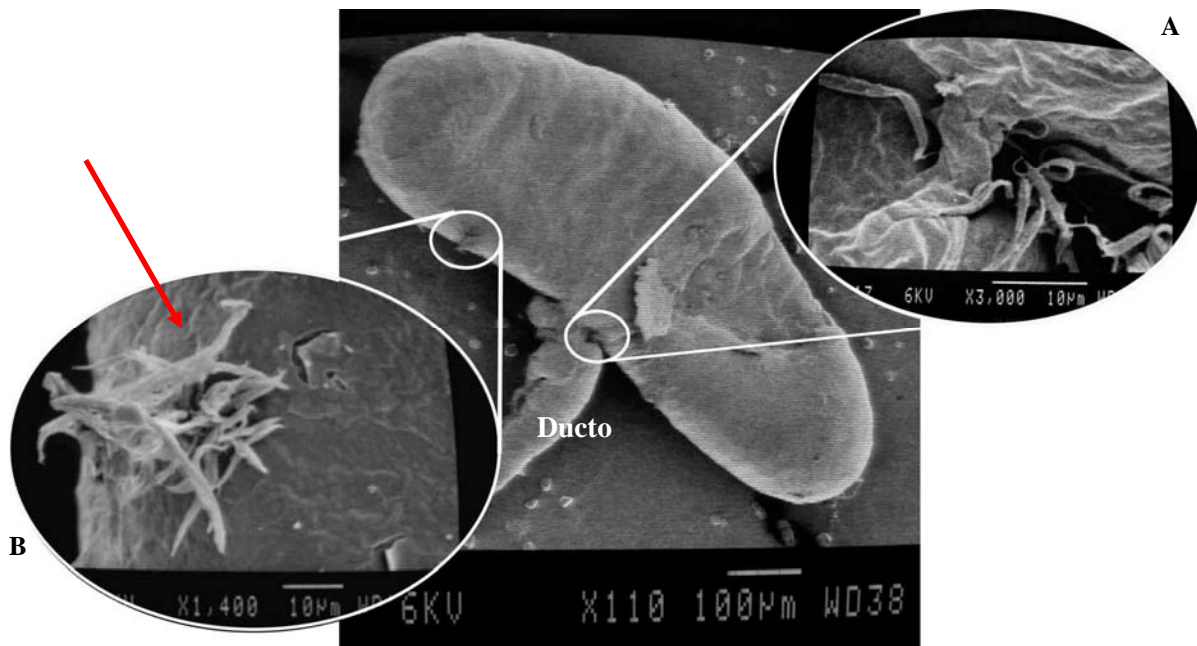


Figura 22. MEV da glândula salivar com infecção de 30 minutos (x110). Em A, presença de flagelados aderidos à lâmina basal próximo ao ducto (x3.000). Em B, flagelados "penetrando" na lâmina basal por uma fenda (seta) (x1.400).

Com 1 hora de infecção, a glândula salivar perdeu a sua forma original durante processamento. Mas apresentaram um número elevado de flagelados aderidos à membrana. O detalhe mostra a penetração de flagelados por uma fenda presente na membrana basal (Figura 23).

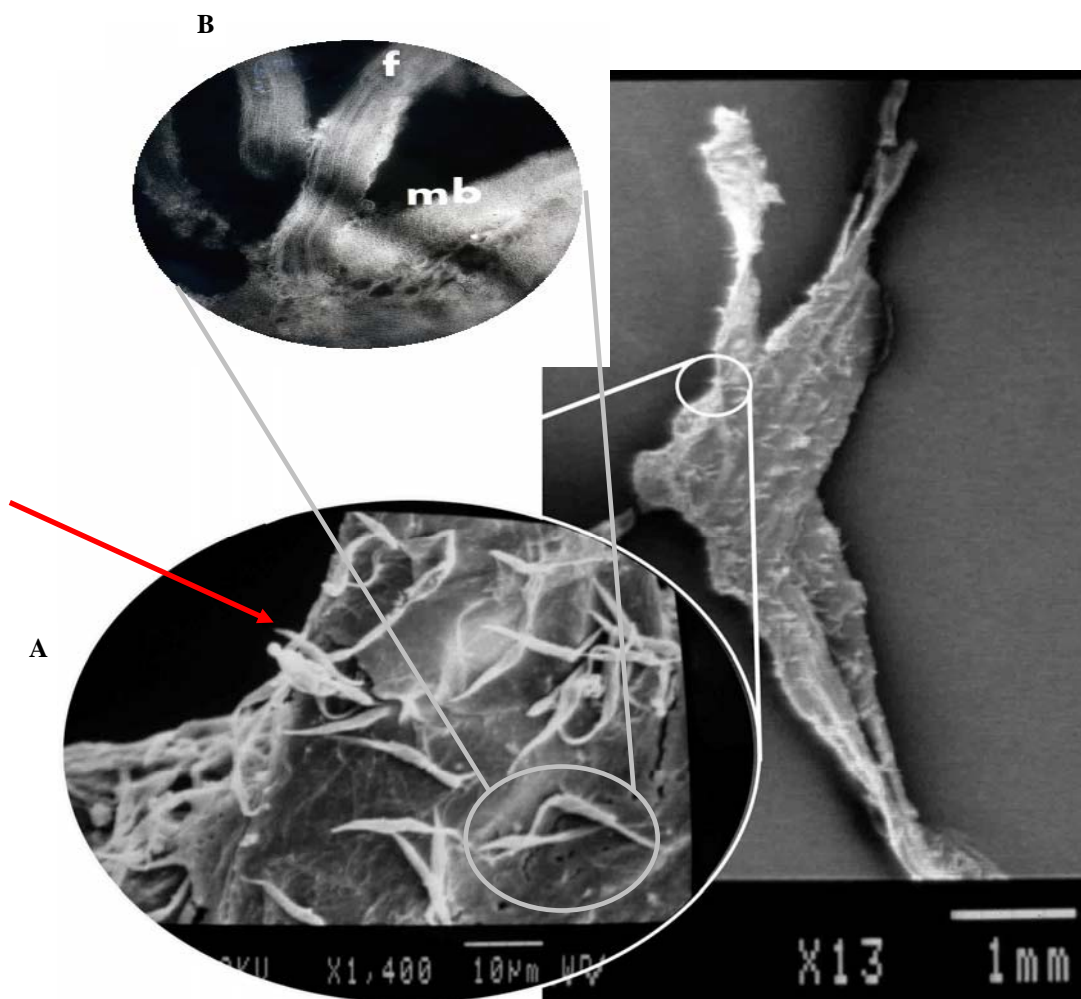


Figura 23. Flagelados aderidos à membrana basal da glândula salivar infectada por 1 hora (x13). Em A, a penetração de alguns flagelados através de uma fenda (seta) (x1.400). Em B, micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão em que se observa o flagelo de *T. rangeli* penetrando na membrana basal da glândula salivar (Figura de Kitajima *et al.* (1998), reproduzida com permissão dos autores).

A glândula infectada por 3 horas, não perdeu a sua forma original e apresentou grumos de flagelados espalhados pela sua membrana penetrando por grandes fendas (A) e vários flagelados aderidos próximo ao ducto (B) (Figura 24). Verificou-se também a presença de flagelados soltos pela membrana basal com características de tripomastigotas longos, com uma membrana ondulante partindo da parte posterior (Figura 25).

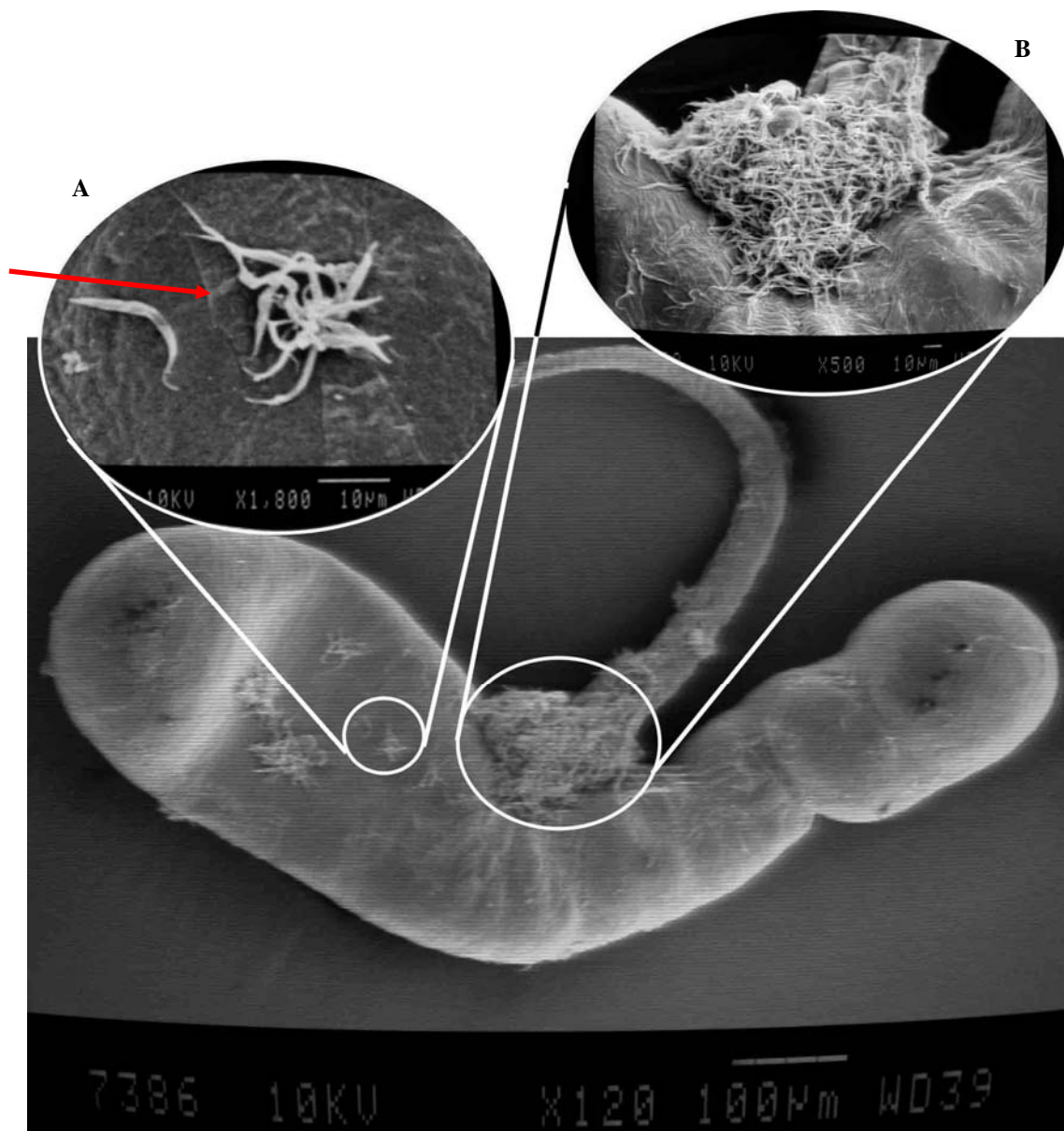


Figura 24. Parasitas aderidos em "grumos" na membrana basal da glândula com 3 horas de infecção (x120). Em A, flagelados "penetrando" na glândula através de uma fenda (seta). Em B, acúmulo de um grande número de flagelados próximos ao ducto salivar (x500).

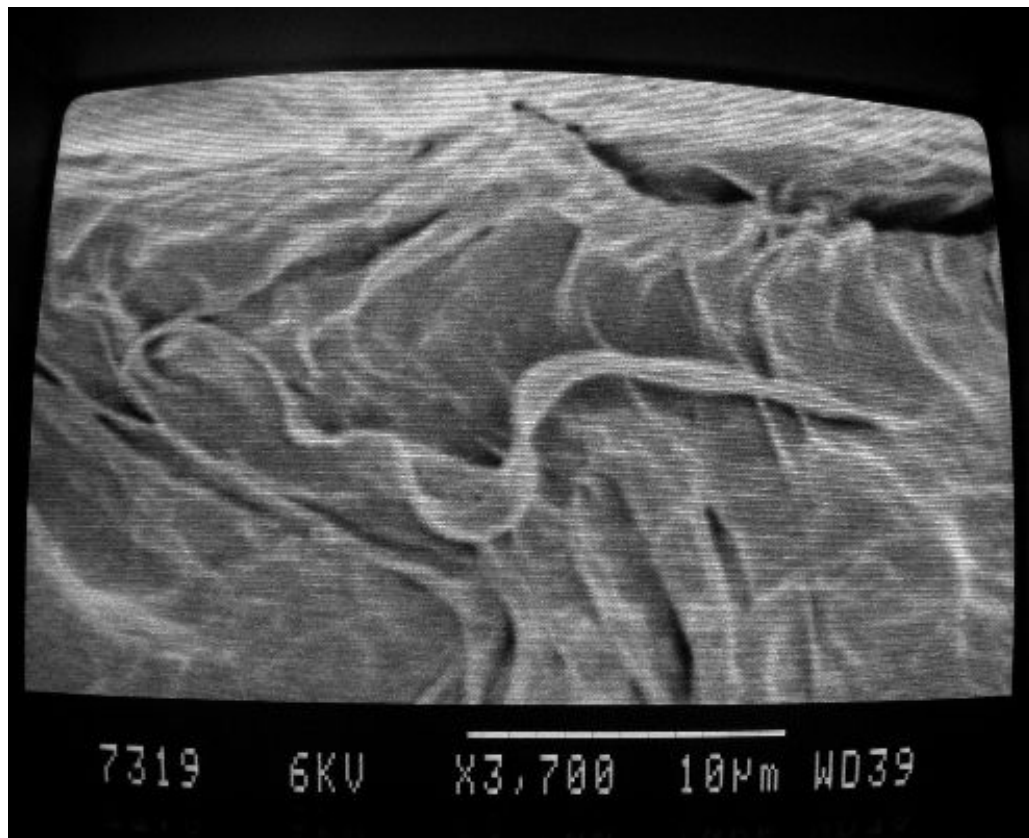


Figura 25. Flagelado aderido na membrana basal com características de forma tripomastigota (x3.700).

Com 24 horas de infecção, a glândula salivar perdeu a sua forma original e se apresentou completamente recoberta por flagelados. Como mostra a figura, não há identificação da lâmina basal (Figura 26).

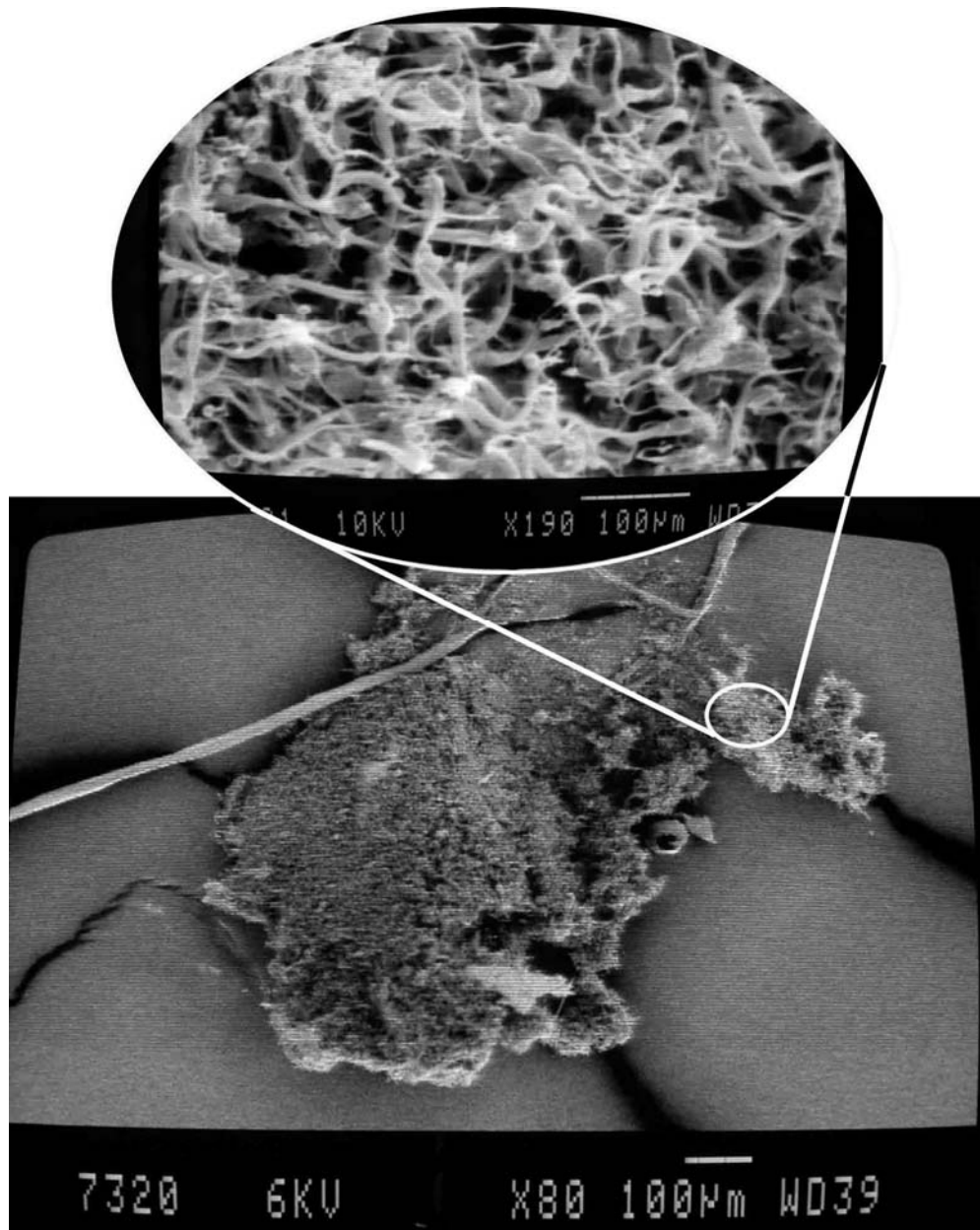


Figura 26. Parasitas cobrindo a membrana basal da glândula salivar infectada por 24 horas (x80). Em destaque o aumento da superfície, mostrando que a glândula está totalmente coberta por flagelados (x190).

Na Microscopia Óptica, não se observou diferença aparente nos fenômenos de adesão e provável penetração entre as glândulas salivares nos diferentes tempos. Nos quatro tempos observou-se os flagelados dirigindo-se em direção à glândula salivar e aparentemente, no início da fase de reconhecimento e adesão (Figuras 27 e 28).



Figura 27. Glândula salivar de *R. robustus* utilizada no processo de infecção *in vitro* em Microscopia Óptica (200x).

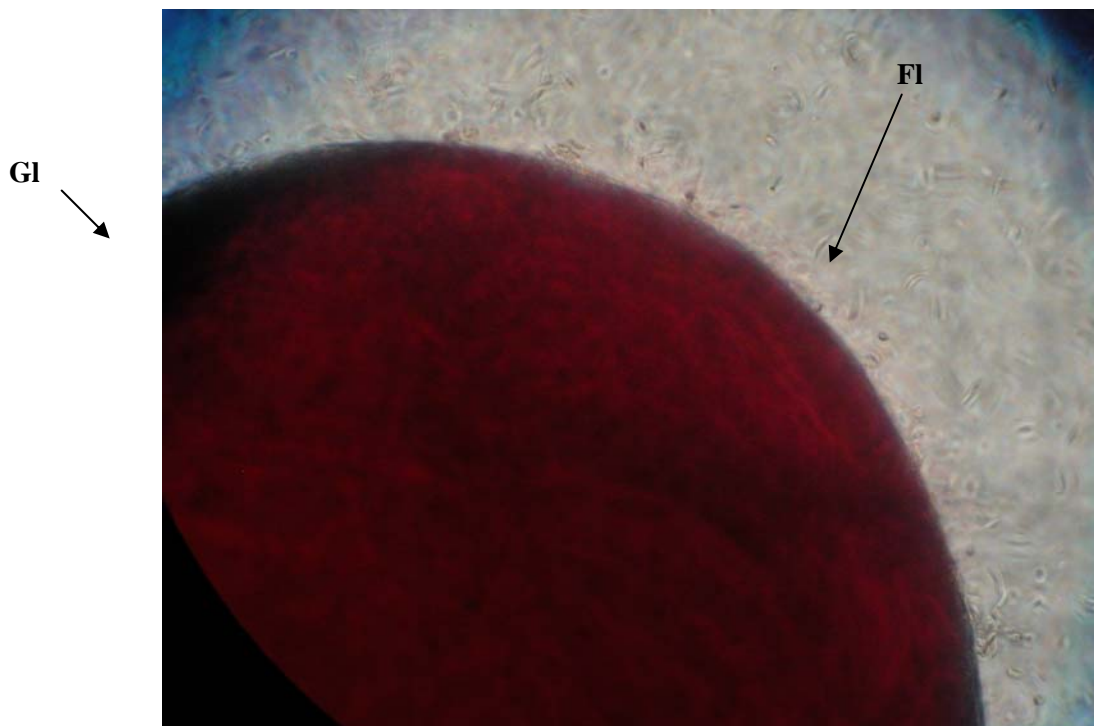


Figura 28. Glândula salivar de *R. robustus* com 3 horas de infecção *in vitro*, visível à Microscopia Óptica. Gl: glândula salivar; Fl: flagelados cobrindo a superfície da membrana basal (400x).

5. DISCUSSÃO

A necessidade de estudar aspectos sobre a biologia, o potencial vetorial e a suscetibilidade à infecção experimental pelo *T. rangeli* de diversas espécies de triatomíneos, é imprescindível. Numerosas publicações têm demonstrado observações de alguns desses parâmetros, principalmente com o objetivo sempre de inferir a potencialidade vetorial dos insetos na transmissão de *T. cruzi* (Crocco *et al.*, 1996; Nogueira-Torres *et al.*, 2000; Guarneri *et al.*, 2000; Nattero *et al.*, 2002; Martínez-Ibarra *et al.*, 2003a;). Entretanto, poucas são as publicações referentes à *T. rangeli*. O modelo por nós utilizado, consistiu em estudos da interação *Rhodnius neglectus* e *R. robustus* – *Trypanosoma rangeli*, espécies reconhecidamente vetoras naturais de *T. rangeli* (Miles *et al.*, 1983; Ramirez *et al.*, 1998; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Mejía, 2005).

5.1 Identificação dos espécimes de *Rhodnius*

Além das conhecidas e muito utilizadas chaves taxonômicas de Lent & Wygodzinsky (1979), o emprego da morfometria geométrica é um outro parâmetro recentemente utilizado na identificação taxonômica dos triatomíneos.

A variação de tamanho das asas de *Rhodnius* derivada da morfometria geométrica, com *R. robustus* apresentando maiores tamanhos, refletiu bem as diferenças do tamanho total do corpo, observadas para as espécies (fêmeas): *R. robustus* (23-26 mm), *R. prolixus* (19,5-21,5 mm), *R. neglectus* (18,5-20,5 mm), *R. nasutus* (14-18 mm) (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Outra diferença de tamanho observada no presente estudo foi a variação no tamanho das asas em relação ao sexo, com asas de fêmeas maiores que as asas de machos. A existência de dimorfismo sexual também é uma característica bem conhecida entre os Triatominae, com fêmeas maiores que machos (Lent & Wygodzinsky, 1979; Gurgel – Gonçalves *et al.*, 2006b).

Os resultados mostram que a forma das asas de *Rhodnius* pode ser utilizada para diferenciar as espécies do gênero *Rhodnius*, gerando dois agrupamentos morfológicos: um formado por (*R. neglectus* + *R. nasutus*) e outro por (*R. robustus* + *R. prolixus*), confirmando as hipóteses filogenéticas (Dujardin *et al.*, 1999, Monteiro *et al.*, 2000). Diferenças de forma de asas também já foram observadas entre espécies de *Rhodnius* da Bolívia (Matias *et al.*, 2001)

e entre *R. prolixus* e *R. robustus* na Venezuela (Villegas *et al.*, 2002), confirmando a importância da morfometria geométrica de asas na taxonomia desses triatomíneos.

5.2 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos

Nas condições de laboratório empregadas neste trabalho, os dados sobre o desenvolvimento ninfal indicam que o período de tempo gasto nas mudas ou ecdises aumenta nos estádios ninfais mais velhos. As mudas são sempre influenciadas pelo repasto sanguíneo. As ninfas que se alimentam com pequena quantidade de sangue levam mais tempo para efetuar a muda ou não conseguem passar ao estágio seguinte se não obtiverem um repasto adicional. Aquelas que conseguem uma repleção total, mudam mais rapidamente.

Geralmente o período de desenvolvimento ninfal dos triatomíneos está relacionado às condições de alimentação, temperatura e umidade a que são submetidos. *R. neglectus* necessitou em média, de menos de um mês na passagem do 1° ao 3° estágio para atingir o estágio seguinte, o que foi também observado para *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus* e *R. robustus* por Silva (1985), para *R. neglectus* por Diotaiuti & Dias (1987) para *R. pictipes* por Rocha *et al.* (1997). Ao que parece, o tipo de sangue utilizado no repasto sanguíneo, teria influência na biologia experimental do inseto, assim, Aldana *et al.* (2001a), utilizou *R. prolixus* alimentado artificialmente com sangue humano e também encontrou um período de desenvolvimento ninfal parecido. No presente trabalho, para *R. robustus*, apenas os estádios I e II necessitaram de menos de um mês para atingir o estágio seguinte.

Para *R. neglectus*, o período de desenvolvimento desde eclosão até a muda imaginal, variou entre 96 e 199 dias com uma média de 156 dias, significativamente menor que o de *R. robustus* em que o período variou entre 182 e 228 com uma média de 204 dias. Essa variação pode ter ocorrido devido às oscilações de temperatura e umidade, que por falta de recursos, não puderam ser rigorosamente controladas. O período de *R. neglectus* pode até ser considerado rápido, se comparado a outras espécies do mesmo gênero, como *R. pictipes* que apresentou uma média de 238 dias (Rocha *et al.*, 1994). Canale *et al.* (1999), citou o ciclo biológico de *R. neglectus*, variando de 81 a 225 dias. Entretanto, é importante salientar que em nosso caso, todas as condições ambientais e de alimentação foram utilizadas igualmente para *R. neglectus* e *R. robustus*.

Muitos exemplares emergem da exúvia com defeitos nas patas, asas e probóscide, o que geralmente dificulta o repasto, levando à morte. A interrupção das ecdises, onde o inseto não conseguiu se desprender totalmente da exúvia, também foi um fator importante para a mortalidade dos insetos do 5º estágio e adultos, o que também foi observado para *R. prolixus* por Lent & Valderrama (1977). Os estádios críticos de mortalidade para *R. neglectus* foram o 1º e o 2º, o que não é considerado comum por vários autores que geralmente apresentam taxas elevadas de mortalidade no 1º e 5º estádios de desenvolvimento, como ocorreu para *R. robustus* (Braga *et al.*, 1999; Martinez-Ibarra *et al.*, 2003b; Aldana *et al.*, 2005). Isso pode ter ocorrido pela dificuldade na realização do primeiro repasto, como a fragilidade do aparelho bucal, dificuldade para alcançar o hospedeiro e atingir um capilar.

5.3 Comportamento alimentar em relação à transmissão do *T. rangeli*

R. robustus e *R. neglectus* demonstraram uma avidez precoce na procura da fonte alimentar. Para *R. robustus*, o intervalo entre o oferecimento da alimentação e a picada foi inferior a 5 minutos para todos os estádios. Já para *R. neglectus*, isso ocorreu com as Ninfas I, II, III e adultos, pois para a Ninfa IV o tempo de aproximação foi de 5,07 minutos e para a Ninfa V foi de 6,5 minutos. Mas não houve diferença significativa, exceto para as Ninfas I das duas espécies. Esse tempo médio de aproximação foi similar para *R. pictipes* (Rocha *et al.*, 1994), para *Meccus longipennis* (Martinez-Ibarra *et al.*, 2003a) e para *Triatoma infestans* e *R. prolixus* (Zeledón *et al.*, 1977).

De acordo com Guarneri *et al.* (2000), quanto mais eficiente é a espécie durante o processo de alimentação, mais curto será o seu tempo de contato com o hospedeiro e maior será sua chance de sobrevivência. Dessa forma, ambas as espécies estudadas podem ser consideradas eficientes no processo de alimentação, já que mostraram similar comportamento para o período de repasto, não havendo diferença significativa.

Nada sabemos em relação à capacidade de *R. neglectus* e *R. robustus* transmitir *T. rangeli*, só pelo fato de introduzir a probóscide e tentar encontrar o respectivo vaso sanguíneo, haja vista que é hematófago, e que suga diretamente na circulação sanguínea, porém, previamente inocula saliva. Este mecanismo tem sido denominado, pelos autores ingleses como “probing”, e é de grande importância no mecanismo de transmissão (tipo “Salivaria”)

via inoculativa pela picada do inseto vetor. Desconhece-se também a ação que a saliva desses triatomíneos exerce na infecção do hospedeiro vertebrado. Conforme o descrito para *R. prolixus*, diversos autores enfatizam sobre o papel que os elementos da saliva dos triatomíneos exercem em fenômenos de vasodilatação, coagulação, anestesia e atividade anti-histamínica (Ribeiro & Garcia, 1980, 1981; Ribeiro *et al.*, 1990; Guimarães & Ribeiro, 1995).

No presente trabalho, *R. neglectus* apresentou um maior número de picadas em todos os estádios, se comparado a *R. robustus*, dessa forma *R. neglectus* se apresentaria mais eficiente para a transmissão de *T. rangeli*, sendo que houve diferença significativa apenas entre a média de picadas das Ninfas IV e V de *R. neglectus* quando comparadas com *R. robustus*. As Ninfas I de ambas espécies, apresentaram o maior número de picadas se comparado aos outros estádios, mas isso provavelmente ocorreu devido à maior dificuldade na detecção de um vaso sanguíneo.

Botto-Mahan *et al.* (2006), estudaram o comportamento de insetos *Mepraia spinolai* não infectados e infectados com *T. cruzi* e citaram que Añez & East (1984), descreveram *R. prolixus* e *R. robustus* infectados com *T. rangeli* apresentaram-se mais vorazes durante a alimentação e apresentaram um maior número de picadas (Garcia *et al.*, 1994).

Esses tipos de experimentos comportamentais em que há comparação de insetos infectados e não infectados, seriam de grande interesse utilizando nossos *Rhodnius* pesquisados nesse trabalho.

As espécies de triatomíneos que defecam durante os primeiros 5 – 10 minutos após a alimentação poderiam ser consideradas transmissoras eficazes de *T. cruzi* (Zeledón *et al.*, 1977). Embora saibamos que a transmissão para *T. rangeli* seja predominantemente inoculativa, todas as ninfas poderiam ser consideradas eficazes para a transmissão de *T. cruzi*, pois todas apresentaram o tempo médio menor ou igual à 5 minutos, exceto a Ninfa I de *R. robustus* que apresentou uma média de quase 8 minutos, mas mesmo assim, ainda encontra-se dentro da média.

De acordo com Nattero *et al.* (2002), a defecação depende da quantidade de sangue ingerido. Quanto maior a quantidade de sangue, menor será o tempo entre o final do repasto e a primeira defecação. No nosso caso, *R. robustus* apresentou diferença significativa na quantidade de sangue ingerido em relação a *R. neglectus*. Mas apesar de haver diferença acentuada entre a quantidade de sangue ingerido para as duas espécies, não há grande

disparidade entre os tempos para as defecações. Alguns insetos defecaram durante a alimentação e isso ocorreu com mais frequência para as ninfas IV, V e adultos, para ambas as espécies. Este parâmetro é importante em se tratando de *T. cruzi*.

As ninfas de 1º estágio de *R. neglectus* não defecaram provavelmente pela ingestão de pouca quantidade de sangue, o que aconteceu também para *R. prolixus*, *R. nevai* e *R. robustus* (Aldana *et al.*, 2001b).

O número de interrupções variou de uma espécie para outra, mas a maioria das interrupções ocorreu pela irritabilidade do hospedeiro (Bar *et al.*, 2003).

A quantidade e qualidade do alimento é muito importante no desenvolvimento dos triatomíneos, o número de ovos produzidos, por exemplo, está diretamente relacionado à quantidade de sangue ingerido.

O peso médio da quantidade de sangue ingerido varia de espécie para espécie, ou mesmo dentro da mesma espécie, inclusive utilizando-se a mesma fonte alimentar, em repastos distintos (Rocha *et al.*, 1997). De acordo com Nattero *et al.* (2002), o estado nutritivo do inseto antes da alimentação, afeta o tamanho do repasto sanguíneo. Quanto maior o estado nutritivo, menor a quantidade de sangue ingerido.

Rocha *et al.* (1997), estudando *R. pictipes* e Silva (1985) estudando 6 espécies de *Rhodnius* também registrou o pico da quantidade de sangue ingerido no 5º estágio e o decréscimo na fase adulta.

Silva, (1985) observando a variação da ingestão de sangue às temperaturas de 25° e 30°C, observou uma quantidade muito maior de sangue ingerido por *R. neglectus* e por *R. robustus* às duas temperaturas.

5.4 Estudo anatômico e histológico das glândulas salivares

O estudo do par de glândulas D1 é importante, porque de acordo com Lacombe (1999) sua função é produzir uma substância anticoagulante, que é excretada para o lúmen da glândula junto com parte do epitélio. Toda a secreção fica contida nos vacúolos dispersos no citoplasma das células glandulares.

De acordo com Guarneri *et al.* (2000), ainda não está bem estabelecido o papel da saliva dos triatomíneos, porém se supõe que ela altere o sítio da picada, favorecendo a localização dos vasos e aumentando o fluxo sanguíneo na área da pele a ser picada.

Mas sabe-se que os triatomíneos desenvolveram nas suas glândulas salivares, uma grande variedade de anti-hemostáticos altamente eficientes, como anticoagulantes e vasodilatadores, que são introduzidos nos hospedeiros. Por outro lado, foi mostrado que a saliva de *R. prolixus* infectado com *T. rangeli* possui menos substâncias anti-hemostáticas, o que provocaria um aumento no tempo de procura por sangue na pele do hospedeiro pelo inseto e favoreceria a transmissão do patógeno (Garcia *et al.*, 1994). Dessa forma, a redução da eficiência alimentar pode ser uma vantagem para o parasito.

5.5 Suscetibilidade experimental dos triatomíneos ao *T. rangeli*

Não houve positividade nas inoculações intracelômicas realizadas nos camundongos de laboratório, com a cepa SC-58. Guhl & Vallejo (2003) relataram que a reprodução do *T. rangeli* em um hospedeiro vertebrado, poderia depender das características da cepa que está sendo utilizada ou poderia estar relacionada à perda de infectividade dos tripanosomas, quando são mantidos *in vitro* por muito tempo. A cepa SC-58, estava sendo mantida isolada em camundongos até chegar ao Laboratório de Parasitologia, onde uma parte passou a ser mantida criopreservada e outra parte foi sendo repicada a cada 15 dias, em meio Ágar Sangue.

O experimento preliminar com a cepa LP-01 recentemente isolada, demonstrou capacidade de infecção intestinal, mas não houve invasão hemolinfática. Entretanto novos experimentos estão sendo planejados.

Também houve certo grau de negatividade entre a cepa e os vetores utilizados, pois a cepa SC-58 não conseguiu se desenvolver completamente, infectando os triatomíneos apenas no trato intestinal. Grisard *et al.* (1999), realizaram infecção experimental em *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. nasutus* com *T. rangeli* com as cepas SC-58, SC-61, Choachi (Colômbia) e Macias (Venezuela) e revelaram que o índice de infecção e a habilidade de transmitir os isolados de Santa Catarina eram significativamente mais baixo quando comparado com as outras cepas, confirmando a variabilidade genética entre as populações do parasita.

De acordo com De Oliveira & De Souza (2003), é sabido que os insetos podem reagir contra um invasor de duas formas diferentes. A primeira é baseada num efeito humoral que pode destruir completamente ou só suprimir o desenvolvimento do invasor. A segunda é baseada numa defesa celular, onde os hemócitos, especialmente plasmócitos e células

granulares da hemolinfa, cercam os invasores e os imobilizam dentro de uma cápsula contendo melanina. Esse é o chamado fenômeno da “encapsulação”. Eles comentam também, que *R. prolixus* são incapazes de gerar um efeito humoral em defesa ao *T. rangeli*, porque os parasitas se multiplicam livremente na hemolinfa, mas os plasmócitos apresentam uma grande capacidade fagocítica, podendo assim ingerir e matar as formas epimastigotas de *T. rangeli*. Em espécies de triatomíneos altamente suscetíveis como o modelo *R. ecuadorienses* – *T. rangeli*, os flagelados infectam a hemolinfa e invadem os hemócitos onde é possível acompanhar a evolução intracelular em parasitas viáveis em seqüência morfogênica culminando na formação de tripomastigotas metacíclicos que são lançados no líquido hemolinfático.

Guhl & Vallejo (2003), observaram que os triatomíneos (particularmente do gênero *Rhodnius*) são suscetíveis às cepas de *T. rangeli* que tem a mesma origem geográfica. Talvez por que *R. domesticus* é a única espécie encontrada em Santa Catarina (Cuba Cuba, 1973), as tentativas de infecções não tiveram sucesso.

Nos xenodiagnósticos, que apresentaram quase 100% de infectados no intestino, quase 80% dos insetos que morreram infectados, morreram por não conseguirem emergir da exúvia, e isso provavelmente aconteceu por causa da infecção por *T. rangeli*, que geralmente causa a morte dos insetos. De acordo com Gulh & Vallejo, 2003, o efeito patológico do *T. rangeli* no *R. prolixus* foi observado primeiramente por Grewal (1956), que observou uma quantidade aumentada de hemolinfa e de deformidades na muda que levaram a uma mortalidade elevada.

Watkins (1971) demonstrou a ação patogênica do *T. rangeli* no intestino de *R. prolixus* através de estudos histológicos minuciosos. Já Cuba Cuba (1973 e 1975a), observou essa interferência do *T. rangeli* com a ecdise em *R. ecuadoriensis* e *Panstrongylus herreri*, fato infelizmente não confirmado por nós, pois não examinamos a situação do tubo digestivo dos insetos mortos infectados.

Foram realizadas tentativas utilizando 3 procedimentos laboratoriais com a cepa SC-58: infecção via alimentação em camundongo infectado, via inoculação intracelômica e via xenodiagnóstico artificial, mas não houve infecção das glândulas salivares. Isso pode ter ocorrido pelo fato de não haver um sistema homólogo, onde o vetor se infecta por uma cepa natural ou a cepa pode ter perdido a sua capacidade de invadir e passar pela hemolinfa.

5.6 Infecção *in vitro* das glândulas salivares

Kitajima *et al.* (1998), encontraram evidências da invasão da glândula salivar por *T. rangeli*, através rompimento ativo da lâmina basal pelo flagelo, mas não conseguiram observar a passagem inteira do corpo do flagelo. Observaram também, que a penetração do *T. rangeli* ocorreu de forma ativa, envolvendo a ruptura da lâmina basal, expondo o citoplasma e facilitando a penetração do flagelo. Em nossos registros, encontramos várias rupturas da membrana basal, onde na maioria das vezes estavam repletos de flagelados penetrando na membrana basal.

De Oliveira & De Souza (2001), em estudos *in vitro* para verificar a potencialidade de invasão do *T. rangeli*, no epitélio intestinal, utilizou fragmentos de intestino de *R. prolixus*, mostrando poucos flagelados presos nas células epiteliais. Mas também registraram agregações de flagelados numa mesma célula, geralmente provocando danos a essas células. Esse estudo mostrou que os flagelados atacaram somente algumas células epiteliais e eles sugerem que provavelmente isso ocorreu porque de alguma maneira determinadas células são reconhecidas pelos flagelados para posterior ataque e invasão.

Por outro lado, Meirelles *et al.* (2005), que estudaram a penetração experimental do *T. rangeli* em glândulas salivares de *R. domesticus*, os flagelados epimastigotas parecem atravessar individualmente, na lâmina basal da glândula salivar, penetrando por pequenos orifícios. Contrariamente, no presente estudo, registrou-se a penetração de vários flagelados agregados, por orifícios maiores e visíveis. Os flagelados encontrados penetrando na membrana basal apresentam características de epimastigotas, já os aderidos na membrana apresentaram características de tripomastigotas. Ao que parece, as formas epimastigotas apresentariam uma maior quantidade de uma molécula lítica, constituída por uma proteína formadora de poros (“a rangelysin” de Meireles *et al.*, 2005), permitindo a passagem dos parasitas pelas barreiras epiteliais. Essas interpretações citadas pelos autores merecem novos e aprofundados estudos a fim de definir com mais clareza este importante mecanismo de invasão glandular.

Interpretamos então nossas observações com o uso da Microscopia de Varredura da seguinte maneira: quando os flagelados (tripomastigotas e/ou epimastigotas), presentes no inoculo preparado nos experimentos *in vitro* de interação parasita x glândulas salivares, se

dirigem e reconhecem o tecido da membrana basal das glândulas, epimastigotas e/ou tripomastigotas se aderem, pelos flagelos, nos primeiros 30 minutos de exposição. Com 1 hora de infecção, observamos que vários agrupamentos (“clusters”) de flagelados são vistos junto aos “poros” ou “orifícios” que, não são vistos na superfície da glândula controle (não infectada). Isto poderia sugerir então que de alguma maneira, os flagelados lesam a membrana basal, com a finalidade de atravessá-la e ganhar passo às células do epitélio glandular, provavelmente utilizando a ponta do flagelo como elemento de agressão, isto quiçá seja melhor comprovado com outro tipo de pesquisas associados à presença de proteínas específicas e/ou outros elementos excretados/secretados via bolsa flagelar presentes em Tripanosomatidae. Do ponto de vista ultraestrutural poderíamos verificar aquilo mostrado por Kitajima *et al.* (1998), com outros estudos apoiados pela Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Pensamos que todos esses eventos iniciais, são de suma importância para o sucesso da infecção das glândulas pelas diversas cepas/genótipos de *T. rangeli* atualmente conhecidos (Vallejo *et al.*, 1988).

Então seria necessário estudar melhor a interação flagelado e células glandulares, e contribuir ao melhor conhecimento do fenômeno de metaciclogênese do *T. rangeli* nos diversos compartimentos que constitui as estruturas histológicas celulares das glândulas salivares do gênero *Rhodnius*. Pensamos que isso resultaria no aprendizado e aperfeiçoamento dos nossos conhecimentos teórico-práticos nas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão em suas diversas modalidades. Um outro passo seria também explorar ainda mais a capacidade de virulência da nossa nova cepa de *T. rangeli* (LP-01), isolada de *R. neglectus* e sua capacidade de infectar no sistema homólogo *R. neglectus* – camundongo – *T. rangeli*, comprovando assim a manutenção da capacidade de virulência por sistema cíclico de manutenção laboratorial.

6. CONCLUSÕES

- ✓ As chaves descritas por Lent & Wygodzinsky, 1979 e a morfometria geométrica mostraram-se igualmente eficazes na identificação taxonômica das espécies estudadas: *R. robustus* e *R. neglectus*. Enfatiza-se o valor da metodologia usada na morfometria geométrica de asas na taxonomia do gênero *Rhodnius*.
- ✓ O período de desenvolvimento ninfal de *R. neglectus* foi significativamente menor que o de *R. robustus*.
- ✓ *R. neglectus* e *R. robustus* apresentaram comportamentos de alimentação e defecação similares, mas com relação ao número de picadas, *R. neglectus* apresentou um maior número de picadas em todos os estádios, e houve diferença significativa entre as Ninfas IV e V se comparado a *R. robustus*, sugerindo dessa forma, ser mais eficiente para a transmissão de *T. rangeli*.
- ✓ As duas espécies também apresentaram diferença significativa entre a quantidade de sangue ingerido. *R. robustus* fez uma ingestão muito maior de sangue se comparado a *R. neglectus*.
- ✓ Os aspectos morfológicos nos cortes histológicos das glândulas salivares de *R. robustus* mostraram elementos estruturais similares ao descrito por Lacombe, 1999.
- ✓ Os três procedimentos laboratoriais utilizados com a cepa SC-58: infecção via alimentação em camundongo infectado, via inoculação intracelômica e via xenodiagnóstico artificial, não apresentaram o desenvolvimento necessário para a infecção das glândulas salivares. Isso pode ter ocorrido pelo fato de não ter sido um sistema homólogo parasita - vetor, onde o vetor se infecta por sua cepa natural ou, a cepa pode ter perdido a sua capacidade de invadir e passar pela hemolinfa com posterior invasão das glândulas.

- ✓ Por parte dos triatomíneos estudados, houve baixa suscetibilidade experimental, provavelmente motivada por características da cepa que perdeu a sua capacidade de virulência.

- ✓ Através das observações feitas com Microscopia Eletrônica de Varredura, interpretamos que, o fenômeno inicial de penetração pelas glândulas salivares, se daria por formas tripomastigotas e/ou epimastigotas, cujo os flagelos atuariam na função de reconhecimento e provavelmente, de injúria, com formação de orifícios na membrana basal das glândulas, através dos quais, os flagelados ganhariam acesso ao epitélio glandular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas citadas segundo o Sistema de Vancouver.

ALDANA, E., LIZANO, E. y VALDERRAMA, A. 2001a. Efecto de la alimentación con sangre humana sobre la fecundidad, fertilidad y ciclo biológico de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. biol. trop*, vol.49, no.2, p.689-692.

ALDANA, E., LIZANO, E. y VALDERRAMA, A. 2001b. Alimentación y defecación em triatomíneos del género *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) alimentados com sangre humana. *Rev. biol. trop*, vol.49, no.2.

ALDANA, E., ZAMORA, E., LIZANO, E. 2005. Biological cycle of *Rhodnius robustus* Larrousse 1927 feeding with human blood in laboratory conditions. *Entomol. Vectores*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1.

AÑEZ, N., EAST, J. S. 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effects on feeding behaviour of triatomine bugs. *Acta Tropica*. 41: 93-95.

BAR, M. E.; MILANO, A. M. F.; DAMBORSKY, M. P.; OSCHEROV, E. B.; AVALOS, G. 2003. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste. Resumen: B-006, Argentina.

BARRETT, T. V. 1988. Current research on Amazonian Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 83(suppl 1):441-447.

BARRETO, M. P. 1979. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. p. 89 – 151. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

BOOKSTEIN, F. L. 1990. Introduction to methods for landmark data. In: FJ Rohlf and FL Bookstein (eds), Proceedings Michigan Morphometrics Workshop 1988. The University of Michigan Museum of Zoology, Special Publication No 2, Ann Arbor, MI pp 216-225.

BOTTO-MAHAN, C. CATTAN, P. E., MEDEL, R. 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Tropica*. 98: 219-223.

BRAGA, M. V.; PRATA, K. C.; BRAZIL, R. P. 1999. Biology of nymphs of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae), fed on pigeon or on swiss mouse blood in laboratory conditions. *Rev. Bras. Biol.*, São Carlos, v. 59, n. 1.

BUXTON, P. A. 1930. The biology of a blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Trans. Entomology. Soc. London* 78: 227-236.

CANALE, M.D.; J. JURBERG; R.U. CARCAVALLO; C. GALVAO; I. GALÍNDEZ GIRON; C. A. MENA SEGURA; D.S. ROCHA & A. MARTINEZ. 1999. Bionomics of some species, p. 839-890. *In: Carcavallo, R.U.; I. Galíndez Girón; J. Jurberg & H. Lent (Eds.) Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas Vol. III, Rio de Janeiro, Fiocruz, 471p.*

CARCAVALLO, R. U., GALÍNDEZ GIRÓN, I., JURBERG, J., LENT, H. 1998. Estádios Ninfais. *In: Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Vol. II. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro. p. 449-514.*

CARCAVALLO, R. U. 2002. *Rhodnius pallescens*: Barber, 1932. *In: Taller Técnico de Estudio sobre Rhodnius pallescens, su Vigilancia y Control. FIOCRUZ.*

COURA, J. R., FERNANDES, O., ARBOLEDA, M., BARRET, T.V., CARRARA, N., DEGRAVE, W., CAMPBELL, D. A. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. Royal Soc. and Trop. Med. Hyg.* 90: 278-279.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O; VALENTE, S. A. S. & MILES, M. A. 2002. Emerging Chagas Disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology*. 18(4), 171-176.

CROCCO, L. B., CATALÃ, S. S. 1996. Feeding and Defecation Patterns in *Triatoma sordida*. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 91(4): 409-413.

CUBA CUBA, C. A. 1973. Evolução de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* em *Rhodnius ecuadoriensis* e *Panstrongylus herreri*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil. p. 84.

CUBA CUBA, C. A. 1975a. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* III. Observações sobre a infecção experimental de *Panstrongylus herreri* Wigodzinski, 1948. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 17(4): 211-277.

CUBA CUBA, C. A. 1975b. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* IV. Observações sobre a evolução e morfogênese do *T. rangeli* na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 17: 284-297.

CUBA CUBA, C. A. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol.31, no.2, p.207-220.

D'ALESSANDRO, A. 1972. New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. *J. Med. Entomology*. 9: 187-195.

D'ALESSANDRO, A. 1976. Biology of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920. In WHR Lumsden & DA Evans, *Biology of Kinetoplastida*, Vol. 1, Academic Press, London, New York and San Francisco, p. 327-493.

D'ALESSANDRO, A., SARAVIA, N. G. 1992. *Trypanosoma rangeli*, In: Kreier J. Baker JR (eds) *Parasitic Protozoa*, 2ª Ed., Academic Press, New York, Vol. 2, p 1-54.

D'ALESSANDRO, A., SARAVIA, N. G. 1999. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases. Edited by: GILLES, H. M., Ed. Arnold, p 398- 412.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. 2001. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. J. Invertebr. Pathol. 77(1):22-6.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. Parasitol. Int. 52(4):299-307.

DIOTAIUTI, L. & DIAS, J.C.P. 1987. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos e camundongos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, 20: 95-100.

DIOTAIUTI, L., SILVEIRA, A. C., ELIAS, M., STEINDEL, M. 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the State of Tocantins, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87: 451.

DIOTAIUTI, L., PENIDO, C. M., PIRES, H. H. R. & DIAS, J. C. P. 1995. Dinâmica de alimentação e dejeção do *Triatoma sordida*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 28 (3): 195-198.

DUJARDIN J. P., CHAVES, T., MORENO, J. M., MACHANE, M., NOIREAU, F., SCHOFIELD, C. J. 1999. Comparasion of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodiini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J. Med. Entomology. 36: 653-659.

ELLIS D S, EVANS D A, STAMFORD S. 1980. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. Z. Parasit. 62: 63-74.

ESPÍNOLA, H. N. 1985. Brasil. In: Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Vol. 2, p. 363-372, ECO/OPS-SNCH/MSAS, Buenos Aires.

FRIEND, W. G., CHOY, C. T. H., CARTWRIGHT, E. 1965. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus*, Stal (Hemiptera: Reduviidae). Can. J. Zool. 43: 891-904.

GALÍNDEZ GIRÓN, I. & TORRES, E. 1999. Morphometry in the systematic and ecology of the Triatominae. *Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas*, vol II, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 561-600.

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.

GARCIA, E. S., MELLO, C. B., AZAMBUJA, P., RIBEIRO, J. M. 1994. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp. Parasitology 78:287-293.

GREWAL, M. S. 1956. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in its vertebrate and invertebrate hosts. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 50: 301-302.

GRISARD, E. C., STEINDEL, M., GUARNERI, A. A. 1999. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: an Overview. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol.94, no.2, p.203-209.

GROOT, H. 1952. Further observations on *Trypanosoma ariarii* of Colombia South America Am. J. Trop. Med. Hyg. 1: 585-592.

GUARNERI, A. A., CARVALHO, M. G., PEREIRA, M. H. 2000. Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. Cad. Saúde Pública, vol.16 supl.2, p.101-104.

GUHL, F. e VALLEJO, G. A. 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol.98, no.4, p.435-442.

GUIMARÃES, J. A. & RIBEIRO, J. M. C. 1995. Salivary gland anti-haemostatic compounds: a tool to define speciation and evolution of blood-sucking triatomines. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz. 90 (Suppl.I), 55-57.

GURGEL-GONÇALVES, R., DUARTE, M. A., RAMALHO, E. D., PALMA, A. R. T., ROMANA, C. A., CUBA CUBA, C. A. 2004. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37(3):241-247.

GURGEL-GONÇALVES, R. & CUBA CUBA, C. A. 2006a. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* em diferentes estações climáticas no Distrito Federal, Brasil. XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses. Uberaba – MG.

GURGEL-GONÇALVES, R.; SANTANA, D. B.; STARLING, J.; FERREIRA, J. B. C.; CUBA CUBA, C. A. 2006b. Identificação de espécies de *Rhodnius* (Hemiptera-Reduviidae) do grupo “prolixus” através da morfometria geométrica das asas. XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses. Uberaba – MG.

HECKER H, SCHWARZENBACH M, RUDIN W. 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviidae bug *Rhodnius prolixus*. Parasitol. Res. 76: 311-318.

HERRER, A. 1964. Reproducción de un *Trypanosoma* tipo *rangeli* a nivel de la glándula salivar del *Rhodnius ecuadoriensis*. Arch. Peruanos de Patol. Clin. 18: 251-254.

HOARE, C. A. 1972. The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. Oxford, Blackwell.

KITAJIMA, E. W., CUBA CUBA, C. A. & BRENER, Z. 1998. Ultrastructural observations on *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* in the salivary glands of *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera, Reduviidae). Parasitol. día, vol.22, no.3-4, p.65-71.

LACOMBE, D. 1999. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 94 (4): 557-564.

LENT, H., JURBERG, J. 1969. O gênero *Rhodnius*, Stal, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev. Bras. Biol. 29: 487-560.

LENT, H., VALDERRAMA, A. 1977. Observações, em laboratório, sobre o ciclo evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1959, *R. pictipes* Stal, 1872 e *R. neivai* Lent, 1953. Rev. Bras. Biol 37: 325-344.

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: 520-529.

MARTINEZ-IBARRA, J. A., GRANT-GUILLEN, Y. & MARTINEZ-GRANT, D. M. 2003a. Feeding, defecation, and development times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Oct., vol.98, no.7, p.899-903.

MARTINEZ-IBARRA, J. A.; GRANT-GUILLEN, Y.; NOGUEDA-TORRES, B. & TRUJILLO-CONTRERAS, F. 2003b. Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 98, n. 2.

MATIAS, A., DE LA RIVA, J. X., TORREZ, M. & DUJARDIN, J. P. 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by wings. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz 96: 947-950.

MEIRELLES, R. M.; HENRIQUES-PONS, A., SOARES, M. J., STEINDEL, M. 2005. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). Parasitol. Res. 97: 259-269.

MEJÍA, G. D. 2005. Aspectos ecológicos de populações silvestres de *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras *Attalea speciosa* (Arecaceae) e estimativa do risco ambiental para a transmissão de *Trypanosomatidae* (Kinetoplastida) em uma frente pioneira de desmatamento (Pará-Brasil). Tese de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasil.

MILES, M. A., ARIAS, J. R., VALENTE, S. A. S., NAIFF, R. D., SOUZA, A. A., POVOA, M. M., LIMA, J. A., CEDILLOS, R. A. 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:1251-1259.

MONTEIRO, F. A., WESSON, D. M., DOTSON, E. M., SCHOFIELD, J., BEARD, C. B. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62 (4): 460-465.

NATTERO, J., CROCCO, L. B. & RODRIGUEZ, C. S. 2002. Feeding and defaecation behaviour of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol.97, no.7, p.1063-1065.

NOGUEDA-TORRES, B., ALEJANDRE-AGUILAR, R., ISITA-TORNELL, L., CAMACHO, A. D. 2000. Defecation Pattern in Seven Species of Triatomines (Insecta, Reduviidae) Present in México. Rev. Latin. Microbiol. 42:145-148.

RAMIREZ, L. E., MACHADO, M. I., MAYWALD, P. G. 1998. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brazil, an endemic region to Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol.31, no.1, p.99-102.

REGIS, L. 1979. The role of the blood meal in egg-laying periodicity and fecundity in *Triatoma infestans*. *Internat. J. Inver. Reprod.* 1: 187-195.

RIBEIRO, J. M. C. & GARCIA, E. S. 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Ins. Physiol.* 26: 303 – 307.

RIBEIRO, J. M. C. & GARCIA, E. S. 1981. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of *Rhodnius prolixus*. *Experientia.* 37: 384 – 386.

RIBEIRO, J. M. C., MARINOTTI, O., GONZALES, R. 1990. A salivary vasodilatador in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Brit. J.Pharmacol.* 101: 932 – 936.

ROCHA, D. S., JURBERG, J., GALVÃO, C. 1994. Biologia do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em Condições de Laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 89(2): 265-270.

ROCHA, D. S., FONSECA, A. H., COSTA, F. A., JURBERG, J. GALVÃO, C. 1997. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, vol. 92(4): 553-558.

ROCHA, D. S., JURBERG, J., CARCAVALLO, R. U. 2001a. Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in laboratory conditions. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol.34, no.4, p.357-363.

ROCHA, D. S., JURBERG, J., CARCAVALLO, R.U. 2001b. Influence of temperature and humidity on the nymphal development of *Rhodnius robustus*. *Rev. Saúde Pública*, vol.35, no.4, p.400-406.

ROHLF, F. J. & MARCUS, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. 8: 129-132.

ROHLF, F. J. 1999a. *TPSDIG*, version 1.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).

ROHLF, F. J. 1999b. *TPSREGR*, version 1.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).

SCHACHTER-BROIDE, J., DUJARDIN, J. P., KITRON, U. & GÜRTLER, R. E. 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J. Med. Entomol.* 41 (4): 643-349.

SILVA, I. G. 1985. Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) e no xenodiagnóstico. Tese Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil, 388 pgs.

SOARES, R. P. P., BARBOSA, S. E., DUJARDIN, J. P., SCHOFIELD, C. J., SIQUEIRA, A. M., DIOTAIUTI, L. 1999. Characterization of *Rhodnius nelgectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology and morphometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94: 161-166.

STEINDEL, M., CARVALHO PINTO, C. J., TOMA, H. K., MANGIA, R. H. R., RIBEIRO-RODRIGUES, R., ROMANHA, A. J. 1991. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina State: First report of this trypanosome in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86: 73-79.

VALLEJO, G. A.; MARINKELLE, C. J.; JUL, F.; DE SÁNCHEZ, N. 1988. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *T. cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *R. prolixus*. *Rev. Bras. Biol.* 48: 577-587.

VILLEGAS, J., FELICIANGELI, M. D. & DUJARDIN, J. P. 2002. Wing shape divergente between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infec. Gen. Evol.* 2:121-128.

WATKINS R. 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invert. Pathol.* 117: 59-66.

ZELEDÓN, R., ALVARADO, R., JIRÓN, J. F. 1977. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica* 34: 65-77.

ANEXO I: Resumo do pôster apresentado na XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses. Uberaba – MG.

ÁREA TEMÁTICA: Epidemiologia e Controle da doença de Chagas

TÍTULO: Qual espécie de *Rhodnius* está invadindo as casas no Brasil Central? Uma abordagem da morfometria geométrica de asas

AUTOR: Rodrigo Gurgel-Gonçalves (UnB e UCB)

CO-AUTORES: Daniella Barreto Santana, Jaqueline Starling, Jônatas B. Cavalcante Ferreira e César A. Cuba Cuba (UnB)

A invasão de espécies de *Rhodnius* no peri/intradomicílio tem sido observada em vários estados brasileiros, porém a identificação específica é dificultada devido à semelhança morfológica entre as espécies, principalmente as do “grupo prolixus” (*Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, *R. nasutus* e *R. neglectus*). O objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Rhodnius* que estão invadindo as casas no Brasil Central através da morfometria geométrica de asas. Foram estudadas 340 asas de 6 populações: *R. neglectus lab* (colônia de laboratório, UnB-DF, n=76), *R. neglectus TO* (silvestre: palmeira *Mauritia flexuosa*, Taguatinga-TO, n=49), *R. neglectus SP* (silvestre: *M. flexuosa*, Buritizal-SP, n=47), *R. prolixus lab* (colônia de laboratório, Colômbia, n=65), *R. robustus PA* (silvestre: *Attalea speciosa*, Marabá-PA, n=70), *R. nasutus BA* (silvestre: *Copernicia cerifera*, Curaçá-BA, n=25) e asas de espécimes de *Rhodnius* spp coletados em ambiente domiciliar em Tocantins, Goiás e Minas Gerais (n=22). As asas foram montadas e sete pontos de referência foram digitalizados. As coordenadas desses pontos foram usadas para analisar a variação de forma e tamanho das asas através de técnicas de morfometria geométrica. As asas de fêmeas foram significativamente maiores que as de machos. Analisando as populações separadamente por sexo, foi observado que as asas menores pertenceram às espécies *R. nasutus BA* e *R. neglectus lab* e as maiores a *R. robustus PA*. A análise da forma das asas mostrou que é possível diferenciar as espécies do “grupo prolixus”, com porcentagens médias de reclassificações corretas de 92% para machos e 85% para fêmeas. Foram observados dois agrupamentos morfológicos: um formado por *R.nasutus+R.neglectus* e outro por *R.prolixus+R.robustus*. Para *R. neglectus* observou-se diferenciação entre populações de diferentes origens geográficas (Buritizal-SP e Taguatinga-TO) e condições ambientais (Laboratório e Silvestre). Esses resultados mostram que é

possível identificar a espécie de *Rhodnius* que está invadindo as casas no Brasil Central analisando a forma e o tamanho das asas. O método permite ainda descobrir a origem dos *Rhodnius* domiciliados, comparando com as asas da coleção de referência de diferentes estados brasileiros.

Anexo II: Cópia do pôster apresentado na XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses. Uberaba – MG.

Qual espécie de *Rhodnius* está invadindo as casas no Brasil Central? Uma abordagem da morfometria geométrica de asas

Rodrigo Gurgel Gonçalves^{1,2}, Daniella Barreto Santana¹, Jaqueline Starling¹, Jônatas B. Cavalcante Ferreira¹ e César A. Cuba Cuba¹. ¹Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília ²Curso de Biologia, Universidade Católica de Brasília, Brasil. E-mail: rgurgel@ucb.br

INTRODUÇÃO

O Gênero *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) é composto atualmente por 14 espécies, a maioria descrita em habitats silvestres, vivendo associadas a palmeiras e ninhos de aves e mamíferos (Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão *et al.* 2003). A invasão de espécies de *Rhodnius* no peridomicílio e intradomicílio tem sido observada de maneira crescente em vários Estados Brasileiros, porém a identificação específica é dificultada devido à reconhecida semelhança morfológica entre as espécies, principalmente as do "grupo prolixus" (*Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, *R. nasutus* e *R. neglectus*) (Figura 1). O objetivo deste estudo foi identificar espécies de triatomíneos do Gênero *Rhodnius* que estão invadindo as casas no Brasil Central através da morfometria geométrica de asas. Essa identificação tem um significado importante em termos de saúde pública, pois pode guiar estratégias de controle vetorial da doença de Chagas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Asas e populações de *Rhodnius* estudadas

Trezentas e quarenta asas foram estudadas provenientes de seis populações de *Rhodnius spp.*, além de 22 asas de espécimes coletados em ambiente domiciliar no Brasil (Tabela 1).

Morfometria e análise estatística

As asas foram montadas entre lâmina e laminula com resina e sete pontos de referência foram tomados por captura de imagem digital (Figura 2). Para cada indivíduo a asa esquerda foi refletida para também ser usada nas análises. As coordenadas desses pontos foram usadas para analisar a variação de forma e tamanho das asas de *Rhodnius* através de técnicas de morfometria geométrica reconhecidas na literatura (Matias *et al.* 2001, Villegas *et al.* 2002, Schachter-Broide *et al.* 2004).

As diferenças de tamanho entre espécies, populações e sexos foram testadas por análises de variância (ANOVA). As variáveis de forma resultantes da análise de deformações foram usadas em análises multivariadas (Análise de Discriminantes-DFA). A significância dessas análises foi testada a partir da estatística F de Goodall (Statistica®). Os softwares usados na morfometria geométrica foram: *tpsDig* e *tpsRebW* (Rohlf, 1999a e b).

RESULTADOS

Um dimorfismo sexual consistente foi observado nas análises de variação de tamanho, sendo as asas de fêmeas significativamente maiores que as de machos ($p < 0,01$). Analisando as populações separadamente por sexo, foi observado que as asas menores pertenceram a espécies *R. nasutus* BA e *R. neglectus* lab e as maiores a *R. robustus* PA, sendo as asas de *R. prolixus* lab e populações silvestres de *R. neglectus* com tamanho intermediário (Figura 3) (ANOVA, $F=85,0$; $p < 0,001$). A análise da forma das asas mostra que é possível diferenciar as espécies do "grupo prolixus", com percentagens médias de reclassificações corretas de 92% para machos e 85% para fêmeas. Foram observados dois agrupamentos morfológicos: um formado por *R. nasutus*+*R. neglectus* e outro por *R. prolixus*+*R. robustus* (Figura 4). A análise das deformações evidencia a diferença de forma entre asas de *R. neglectus* e *R. robustus* (Figura 5). Para *R. neglectus* observa-se diferenciação entre populações de diferentes origens geográficas (Buritizal-SP, Brasília-DF e Taguatinga-TO) e condições ambientais (Laboratório e Silvestre) (Figura 6).

CONCLUSÕES

- Os resultados mostram que é possível identificar a espécie de *Rhodnius* que está invadindo as casas no Brasil através da morfometria geométrica de asas: em Goiás e Minas Gerais são espécimes de *R. neglectus* e em Tocantins espécimes de *R. neglectus* e *R. robustus*.
- Através dessa técnica é possível também descobrir a origem geográfica dos *Rhodnius* domiciliados, comparando com as asas da coleção de referência de diferentes Estados do Brasil Central.

REFERÊNCIAS

- Lent H, Wygodzinsky P. 1979. *Bulletin American Museum of Natural History* 163: 520-529.
 Matias A. de la Riva JX, Torrez, M & Dujardin, JP. 2001. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 947-950.
 Rohlf FJ. 1999a. *TPSDIG*, version 1.18. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
 Rohlf FJ. 1999b. *TPSRELW*, version 1.18. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
 Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U & Gürtler RE. 2004. *Journal of Medical*

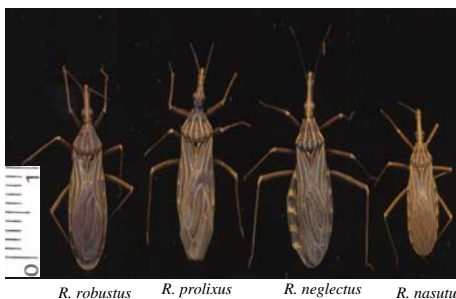


Figura 1. Espécies de *Rhodnius* do grupo prolixus.

Tabela 1. Origem, habitat, coordenadas geográficas e número de asas de machos e fêmeas das populações de *Rhodnius* estudadas por morfometria geométrica.

Populações	Origem	Coordenadas	Nº Machos	Nº Fêmeas	Habitat
<i>R. neglectus</i> *	Buritizal, Brasil	SP, 20°11'S, 47°42'W	30	17	Palmeiras flexuosa (M.)
<i>R. neglectus</i> *	Taguatinga, Brasil	TO, 12°23'S, 46°24'W	26	23	Palmeiras flexuosa (M.)
<i>R. neglectus</i> *	Brasília, Brasil	DF, 15°55'S, 47°54'W	35	36	Laboratório
<i>R. robustus</i> *	Benfica, Brasil	PA, 5°16'S, 49°50'W	35	35	Palmeiras speciosa (A.)
<i>R. nasutus</i> **	Curaçá, BA, Brasil	8°59'S, 39°54'W	14	11	Palmeiras cerifera (C.)
<i>R. prolixus</i> **	Ibague, Tolima, Colômbia	2°59'N, 74°29'W	36	29	Laboratório
<i>Rhodnius spp</i>	Ituiutaba, Brasil	MG, 18°57'S, 49°35'W	3	3	Domicílios
<i>Rhodnius spp</i>	Tocantópolis, Brasil	TO, 6°19'S, 47°24'W	2	8	Domicílios
<i>Rhodnius spp</i>	Quirinópolis, Brasil	GO, 18°28'S, 50°27'W	4	0	Domicílios
<i>Rhodnius spp</i>	Taguatinga, Brasil	TO, 12°23'S, 46°23'W	2	0	Domicílios

* Populações naturais. ** F1 misturado com F2. ** Colônias estabelecida há mais de 2 anos em laboratório

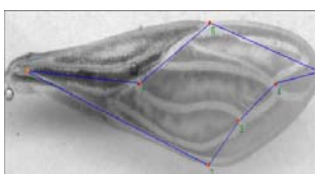


Figura 2. Asa direita de *Rhodnius neglectus* com os sete pontos de referência usados nas análises morfométricas.

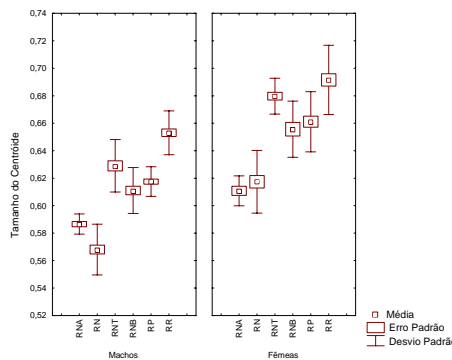


Figura 3. Variação do tamanho do centróide entre populações e sexos de espécies de *Rhodnius*. Legenda: RNA (*R. nasutus*), RN (*R. neglectus* laboratório), RNT (*R. neglectus* silvestre, Taguatinga-TO), RNB (*R. neglectus* silvestre, Buritizal-SP), RP (*R. prolixus*) e RR (*R. robustus*).

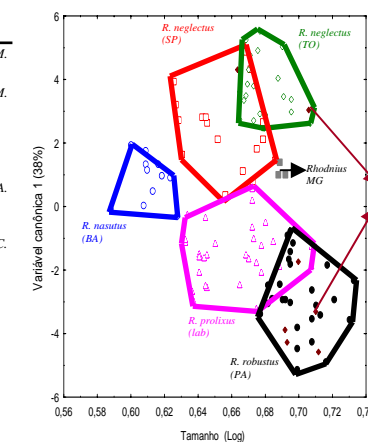
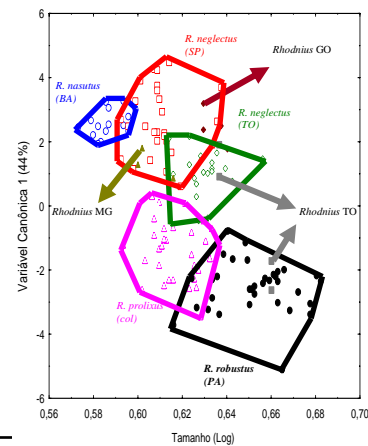


Figura 4. Mapas fatoriais mostrando a variação de tamanho e forma entre machos (acima) e fêmeas (abaixo) de populações de diferentes origens geográficas, incluindo espécimes coletados nos domicílios (*Rhodnius*). Os polígonos correspondem às diferentes populações estudadas. A porcentagem de contribuição da variável canônica está entre parênteses.

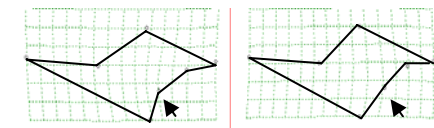


Figura 5. Deformações relativas observadas para *R. neglectus* (esquerda) e *R. robustus* (direita) através da morfometria geométrica de asas. As setas indicam a região da asa onde foi observada maior diferença de forma.

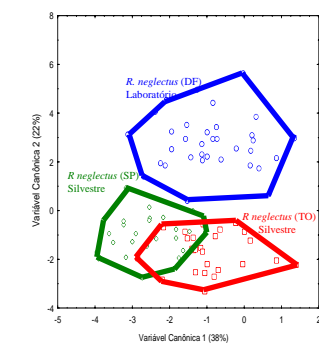


Figura 6. Mapa fatorial mostrando a variação de forma entre machos de populações de diferentes origens geográficas (Buritizal-SP, Brasília-DF e Taguatinga-TO) e condições ambientais (Laboratório e Silvestre).