

## Histology of follicular development of hybrids between *Triatoma infestans* Klug, 1864 and *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (Hemiptera: Heteroptera)

## HISTOLOGÍA DEL DESARROLLO FOLICULAR DE HÍBRIDOS ENTRE *Triatoma infestans* Klug, 1864 Y *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (HEMIPTERA: HETEROPTERA)

Federico Gastón FIAD<sup>1</sup><sup>\*</sup>, Fernando José CAREZZANO<sup>2</sup>, Miriam CARDOZO<sup>1</sup>, Claudia Susana RODRÍGUEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Introducción a la Biología. Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT-CONICET). Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Morfología Animal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

\* **For correspondence:** federico.fiad@mi.unc.edu.ar

**Received:** 6<sup>th</sup> May 2020. **Returned for revision:** 27<sup>th</sup> August 2020. **Accepted:** 22<sup>nd</sup> September 2020.

**Associate Editor:** Héctor Gasca Alvarez

**Citation/ citar este artículo como:** Fiad FG, Carezzano FJ, Cardozo M, Rodríguez CS. Histology of follicular development of hybrids between *Triatoma infestans* KLUG, 1864 and *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (Hemiptera: Heteroptera). Acta Biol Colomb. 2021;26(3):462-465. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.87029>

### RESUMEN

*Triatoma infestans* y *Triatoma platensis* son especies interfértiles que en ocasiones comparten ecotopos y producen híbridos fértiles naturales. El cruzamiento interespecífico podría permitir la producción de genotipos híbridos capaces de colonizar nuevos hábitats. Por ello, los estudios de aspectos reproductivos sobre estos organismos son de gran importancia. En este sentido la ovogénesis, proceso que implica el desarrollo del ovocito y permite la formación de huevos viables, es un aspecto relevante. En este estudio se caracterizaron aspectos histológicos enfocados en el desarrollo folicular de híbridos experimentales. Para ello, se extrajeron los ovarios de 35 hembras híbrido, se embebieron en parafina y colorearon con hematoxilina-eosina. Se caracterizó el desarrollo del epitelio folicular y del ovocito en las etapas de previtelogénesis y vitelogénesis, encontrándose que la ovogénesis de las hembras híbrido se encuentra bien definida produciendo huevos viables y que los cambios ocurridos a nivel histológico se asemejan a los registrados en *T. infestans*.

**Palabras clave:** biología reproductiva, ciclo ovárico, ovogénesis, Triatominae.

### ABSTRACT

*Triatoma infestans* and *Triatoma platensis* are interfertile species that frequently share ecotopes and produce natural fertile hybrids. Interspecific crossing allows the production of more suitable hybrid genotypes capable of colonizing new habitats. Therefore, studies of reproductive aspects in hybrids are of great importance. In this sense, oogenesis, a process that involves the development of the oocyte and allows the formation of viable eggs, is a relevant aspect. In this study, histological aspects focused on the follicular development of experimental hybrids were characterized. To do this, the ovaries of 35 hybrid females were removed, paraffin-embedded and stained with hematoxylin-eosin. The development of the follicular epithelium and the oocyte in the stages of previtellogenesis and vitellogenesis were characterized, finding that the oogenesis of the hybrid females is well defined producing viable eggs and that the changes occurred at the histological level resemble those registered in *T. infestans*.

**Keywords:** oogenesis, ovarian cycle, reproductive biology, Triatominae

Los Triatominae son insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae (Heteroptera). Esta subfamilia cuenta con 151 especies divididas en cinco tribus y siete géneros (Justi y Galvão, 2017). La mayoría de estas especies han demostrado poder infectarse de forma natural o experimental con *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, agente etiológico causante de la enfermedad de Chagas (Schofield y Galvão, 2009). *Triatoma infestans* Klug, 1834 se distribuye en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay es una especie con importancia epidemiológica primaria que coloniza tanto domicilios como anexos peridomiciliarios (Gürtler *et al.*, 2014; Belliard *et al.*, 2019). Por otro lado, *Triatoma platensis* Neiva, 1913, de importancia epidemiológica secundaria (Schofield y Galvão, 2009), se distribuye en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Salvattella *et al.*, 1991; Galvão *et al.*, 2003; Coscarón, 2017). En ambientes silvestres se encuentra asociada a nidos de Furnariidae y Psitaciidae, mientras que en el ambiente humano se halla en corrales de aves domésticas o bien, vuela hacia la vivienda atraída por la luz (Ferrero *et al.*, 1999; Martí *et al.*, 2014; Cavallo *et al.*, 2016).

Estas especies, que pertenecen al subcomplejo Infestans, son interfértiles produciendo descendencia híbrida fértil en condiciones experimentales (Pérez *et al.*, 2005) y en ambientes silvestres, donde Martí *et al.* (2014) registraron colonias mixtas con la presencia de individuos híbridos. Esta capacidad de entrecruzamiento interespecífico permitiría la producción de nuevos genotipos híbridos resultando en adaptaciones evolutivas que podrían permitir la colonización de nuevos hábitats (Pérez *et al.*, 2005). Por otro lado, las intervenciones humanas en los ambientes naturales pueden aumentar el riesgo epidemiológico, facilitar la emergencia de enfermedades endémicas y crear nuevos entornos adecuados para la integración y cruzamiento entre especies (Correia *et al.*, 2013). Es por ello que estudiar aspectos relacionados con la biología reproductiva de híbridos contribuye al conocimiento de la dinámica poblacional, dispersión y potencial adaptación a diferentes hábitats (Gurevitz *et al.*, 2006).

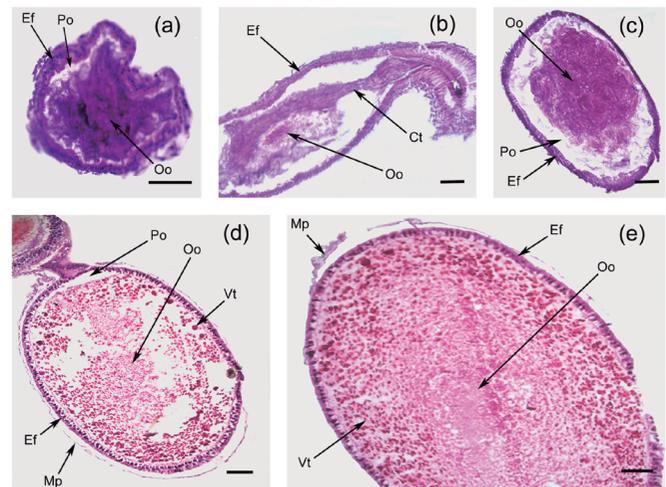
Un aspecto relevante, en la biología reproductiva de las hembras híbridas es la ovogénesis, proceso que se desarrolla en los folículos ováricos, es un período de rápido crecimiento y diferenciación celular que ocurre en tres estadios: previtelogénesis que implica la diferenciación del ovocito, vitelogénesis donde se acumula vitelo y por último coriogénesis donde se depositan las capas del corion (Fruttero *et al.*, 2011; Lynch y Roth, 2011).

En este estudio se caracterizaron aspectos histológicos de la biología reproductiva de híbridos experimentales de *T. infestans* y *T. platensis* enfocados en el desarrollo folicular.

Los híbridos se obtuvieron de una colonia de 20 hembras adultas de *T. infestans* silvestres y 20 machos adultos de *T. platensis* de primera generación de laboratorio. Los triatominos fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ( $27 \pm 1$  °C), humedad ( $60 \pm 10$  %) y fotoperíodo

(12: 12 luz-oscuridad). Cada 15 días se les ofreció alimento sobre paloma (*Columba livia*, Gmelin, 1789) con movimiento restringido y sin anestesiarse, hasta la obtención de 35 hembras adultas. Estas fueron alimentadas a repleción al séptimo día posterior a la muda, y se emparejaron con machos híbrido bien alimentados. Una vez comprobada al menos una cópula, a través de la presencia del espermatóforo, el macho fue retirado y a la hembra se le ofreció nuevamente comida. Aquellas alimentadas a repleción fueron asignadas a distintos grupos de sacrificio, según el número de días transcurridos después de la última ingesta (0, 3, 5, 7, 10, 14 y 16 días post ingesta), a fin de obtener folículos basales en sus distintos estadios. Transcurrido el tiempo estimado se extrajeron los ovarios de las hembras sacrificadas y se fijaron en buffer fosfato salino (PBS) a pH = 7. Luego se deshidrataron en soluciones de etanol de graduación creciente, aclararon en xilol e incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes a  $7 \mu\text{m}$  y colorearon con hematoxilina-eosina (Tolosa *et al.*, 2003).

En relación a la histología del proceso de desarrollo folicular, este inicia con ovocitos en previtelogénesis temprana, de estructura fibrosa y homogénea, con volumen reducido, alimentados por cordones tróficos de similares características, típicos de ovarios telotróficos meroísticos, los que conectan las haplocélulas con el estroma del germario (Fig. 1a, b). Durante la previtelogénesis tardía, los ovocitos manifiestan un importante crecimiento en volumen, el citoplasma aumenta considerablemente de tamaño, por la acumulación de nutrientes provenientes del germario



**Figura 1:** Secuencia de desarrollo folicular en ovarios de hembras híbridas entre *T. infestans* y *T. platensis* (a-e). a) Ovocito en previtelogénesis temprana (corte transversal) (200X HE, barra de escala =  $300 \mu\text{m}$ ). b) Ovocito en previtelogénesis temprana (corte longitudinal) (100X HE, barra de escala =  $300 \mu\text{m}$ ). c) Ovocito en previtelogénesis tardía (100X HE, barra de escala =  $300 \mu\text{m}$ ). d) Ovocito en vitelogénesis temprana (100X HE, barra de escala =  $300 \mu\text{m}$ ). e) Ovocito en vitelogénesis tardía (100X HE, barra de escala =  $300 \mu\text{m}$ ). Ct: cordón trófico; Ef: epitelio folicular; Mp: membrana peritoneal; Oo: ooplasma; Po: espacio perioocítico.

conservando la estructura fibrosa (Fig. 1c). La fase de vitelogénesis temprana se caracteriza por la degeneración de los cordones tróficos y el ingreso de vitelogeninas desde la periferia formando gotas de vitelo con la consecuente reclusión del ooplasma hacia el centro de la célula (Fig. 1d). Una vez finalizado el proceso de acumulación de vitelo, el interior de la gameta se encuentra repleto de gránulos y sustancias de reserva, lo que aumenta rápidamente su volumen en vitelogénesis tardía (Fig. 1e).

En relación al desarrollo del epitelio folicular se advierten cambios en los diferentes estadios. En previtelogénesis temprana, el folículo basal está rodeado por un epitelio simple con células pequeñas y fusiformes, con un núcleo central y cromatina condensada, lo que denota poca actividad (Fig. 2a). En previtelogénesis tardía las células del tejido epitelial adquieren formas cilíndricas, con núcleos centrales redondeados y cromatina laxa haciéndose notoria la presencia del nucléolo. Este cambio a nivel nuclear indica un aumento de la actividad metabólica (Fig. 2b). En la vitelogénesis temprana, a nivel del epitelio, ocurre divisiones mitóticas sin cariocinesis, de modo que todas las células se observan binucleadas, voluminosas y cilíndricas, presentando el extremo basal en contacto con el espacio perioocítico y el apical con la membrana peritoneal que separa al ovocito de la hemolinfa, además el volumen de los núcleos aumenta notándose la cromatina aún más laxa que en la fase anterior. Cabe destacar la presencia de un nucléolo en cada núcleo (Fig. 2c). En la fase de vitelogénesis tardía, se produce un estiramiento del epitelio folicular

como consecuencia del aumento rápido de volumen que sufre la gameta por el ingreso de sustancias de reserva y agua generando un achatamiento del tejido, en esta situación las células se observan con forma cúbica, de menor tamaño y manteniendo el carácter binucleado con núcleos pequeños (Fig. 2d).

Los resultados evidencian que las fases del desarrollo folicular en hembras híbrido se encuentran bien definidas produciendo huevos viables con un microambiente apto para dar lugar a la embriogénesis y que los cambios ocurridos a nivel histológico en los folículos basales se asemejan a los registrados en *T. infestans* (Barth, 1973). Estos resultados corroboran lo propuesto por Pérez *et al.* (2005), sobre la existencia de híbridos fértiles, del subcomplejo Infestans, con capacidad de generar descendencia viable, lo cual sumado a la invasión de ambientes humanos por especies silvestres podría sugerir la existencia de colonias naturales híbridas asociadas a ecotopos domésticos, que funcionen como refugio para estos híbridos y que ocasionalmente puedan dispersarse hacia la vivienda humana convirtiéndose en un riesgo para la salud de sus ocupantes, en este sentido, López *et al.* (2020) describen y comparan el patrón de ingesta y defecación de híbridos con *T. infestans*, señalando que adultos y ninfas híbridos poseen comportamientos de alimentación y defecación similares a *T. infestans* concluyendo que estos organismos podrían tener un potencial relativamente alto de transmisión de *T. cruzi* convirtiéndose en un riesgo epidemiológico de importancia. Por ello, indagar con mayor profundidad en el estudio de la eficiencia reproductiva del híbrido cobra importancia desde el punto de vista de la capacidad de colonización de la vivienda, de la capacidad vectorial y del control de triatominos.

## AGRADECIMIENTOS

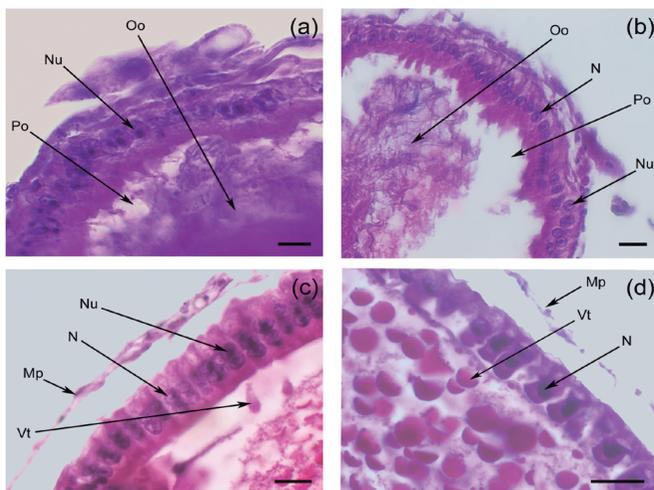
A la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba Argentina por el financiamiento de este proyecto. Al Centro de Referencia de Vectores (CEREVE) por aportar los especímenes de triatominos y sus instalaciones de cría para el mantenimiento de las colonias. Al Biól. Raúl L. Stariolo por brindar su apoyo en el cuidado de las colonias y la obtención de híbridos. A la Biól. Alejandra Trench por facilitarnos el uso de la óptica y cámara digital para obtener las imágenes histológicas.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Barth R. Estudios anatomicos e histológicos sobre a subfamilia Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). Parte XXIII: O ovário de *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1973;71(1-2): 123-137. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761973000100008>



**Figura 2:** Secuencia de desarrollo de las células del epitelio del folículo basal en ovarios de hembras híbridas entre *T. infestans* y *T. platensis* (a-d). a) Epitelio folicular de ovocito en previtelogénesis temprana (800X HE, barra de escala = 100 µm). b) Epitelio folicular de ovocito en previtelogénesis tardía (400X HE, barra de escala = 100 µm). c) Epitelio folicular binucleado de ovocito en vitelogénesis temprana (400X HE, barra de escala = 100 µm). d) Epitelio folicular de ovocito en vitelogénesis tardía (400X HE, barra de escala = 100 µm). Mp: membrana peritoneal; N: núcleo; Nu: nucléolo; Oo: ooplasma; Po: espacio perioocítico; Vt: vitelo.

- Belliard SA, de la Vega GJ, Schilman PE. Thermal Tolerance Plasticity in Chagas Disease Vectors *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and *Triatoma infestans*. *J Med Entomol*. 2019; 56 (4): 1-7. Doi: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz022>
- Cavallo JM, Amelotti I, Gorla DE. Invasion of rural houses by wild Triatominae in the arid Chaco. *J Vector Ecol*. 2016; 41 (1): 97-102. Doi: <https://doi.org/10.1111/jvec.12199>
- Correia N, Almeida CE, Lima-Neiva V, Gumiel M, Dornak LL, Lima MM, *et al*. Cross-mating experiments detect reproductive compatibility between *Triatoma sherlocki* and other members of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Trop*. 2013; 128 (1): 162-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.019>
- Coscarón MC. A Catalogue of the Heteroptera (Hemiptera) or true bugs of Argentina. 1 ed. Auckland: Magnolia Press; 2017. p. 253 – 307. Doi: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4295.1.1>
- Ferrero AA, Visciarelli EC, Torno O, Costamagna SR. Presencia de *Triatoma patagonica* en viviendas humanas en la ciudad de Río Colorado, provincia de Río Negro. *Rev Soc Entomol Argent*. 1999; 58(3-4): 79-84.
- Fruttero LL, Frede S, Rubiolo ER, Canavoso LE. The storage nutritional resources during vitellogenesis in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): The pathways of lipophorin in lipid delivery to developing oocyte. *J Insect Physiol*. 2011; 57: 475-486. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.01.009>
- Galvão C, Carcavallo R, Silva Rocha D, Jurberg, J. 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*. 2003; 202: 1-36.
- Gurevitz JM, Ceballos LA, Kitron U, Gürtler E. Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. *J Med Entomol*. 2006; 43:143- 150.
- Gürtler RE, Cécere MC, Fernández M, Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Cohen JE. Key source habitats and potential dispersal of *Triatoma infestans* populations in Northwestern Argentina: implications for vector control. *PLOS Negl Trop Dis*. 2014; 8 (10): e3238. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003238>
- Justi SA, Galvão C. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends Parasitol*. 2017; 33 (1): 42-52. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002>
- López AG, Cardozo M, Oscherov EB, Crocco LB. Dynamic of feeding and defecation behavior of *Triatoma infestans* hybrids. *Parasitol Res*. 2020; 119: 2775-2781. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06822-0>
- Lynch JA, Roth S. The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. *Gene Dev*. 2011; 25: 107-118. Doi: <https://doi.org/10.1101/gad.2010711>
- Martí GA, Echeverría MG, Waleckx E, Susevich ML, Balsalobre A, Gorla DE. Triatominae in furnariid nests of the Argentine Gran Chaco. *J Vector Ecol*. 2014; 39 (1): 66-71. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12071.x>
- Pérez R, Hernández M, Quinteros O, Scvortzoff E, Canale D, Méndez L, *et al*. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica*. 2005; 125: 261-270. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10709-005-0369-z>
- Salvatella R, Basmadjian Y, Rosa R, Martínez M, Medrano G, Civila E. *Triatoma platensis*. Hallazgo de *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (Hemiptera, Triatominae) en el estado brasileño de Río Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991; 33(1): 1-5. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000100001>
- Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution and species group within the Triatominae. *Act Trop*. 2009; 110(2-3): 88-100. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Neto AGF. Manual de técnicas para histología normal e patológica. São Paulo: Manole; 2003. p. 34-41.