

Sueli Gardim

**Diagnóstico molecular e relações filogenéticas entre
nove espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas - UNESP, Câmpus Araraquara,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

ARARAQUARA - SP
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- G219 Gardim, Sueli
Diagnóstico molecular e relações filogenéticas entre nove espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) / Sueli Gardim. – Araraquara, 2013
100 f.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: João Aristeu da Rosa
1. Doença de Chagas. 2. Filogenia. 3. Revisão taxonômica. 4. Triatominae. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcuta

Todo o argumento permite sempre a discussão de duas teses contrárias, inclusive este de que a tese favorável e contrária são igualmente defensáveis.

Protágoras de Abdera

*Dedico esta Tese...
...aos amores da minha vida!*

Meu marido Paulo Vitor Esposto Curti pelo apoio e acolhimento em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Aos meus pais, Rubens Paulo Gardim e Nilce Aparecida Florio Gardim, que dignamente me ensinaram a importância da família e o caminho da honestidade e da persistência.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

Agradecimento

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela orientação no desenvolvimento desta Tese, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, principalmente nos momentos de ansiedade. Ao senhor, a minha sincera gratidão.

Agradecimentos especiais

À Deus por me presentear com vida e saúde para concretizar meus ideais.

À minha família, em especial às minhas irmãs Nanci Gardim e Marli Gardim, pela paciência, apoio e carinho.

Aos melhores amigos do mundo Hebert Fabricio Tortoreli Quadrado, Marco Aurélio Rodrigues, Pedro Luis Faga Celli, César Augusto Toniello de Alcântara, Adriano Benacci, Daniel Mana, Leticia Carla Gomes e Paloma Pompeu Fusco, representantes das alegrias cotidianas e com presença sempre marcante em minha vida. À vocês meu muito obrigada pela competência em mostrar-me como a vida é maravilhosa ao me proporcionar a honra da (tão acolhedora) companhia de vocês.

Aos membros do Laboratório de Parasitologia (FCFAr – UNESP):

Às professoras Mara Cristina Pinto e Márcia da Silva Graminha, por despertar seus alunos para a pesquisa, e pelos ensinamentos e experiências compartilhados.

Aos colegas Carlos Eduardo Almeida, Danila Blanco de Carvalho, Eloísa Pinotti, Eder dos Santos Souza, Jader de Oliveira, Patrícia Lopes, Thais Goulart, Cláudia Solano Rocha, Júlio César Miné, Vagner José Mendonça, Aline Rimoldi Ribeiro, assim como, todos que fizeram parte deste grupo de pesquisa, mesmo que temporariamente (estagiários e alunos estrangeiros), agradeço pelo auxílio, amizade e companheirismo.

Às técnicas Isabel Martinez e Terezinha Ricci, pelo auxílio com as técnicas laboratoriais que tanto contribuíram para meu crescimento profissional e minha formação.

Aos vários colaboradores que possibilitaram e apoiaram o desenvolvimento de um projeto e a concretização de um sonho:

À professora Regina Maria Barretto Cicarelli (FCFAR – UNESP) pela solicitude, prontidão e suporte experimental.

À Daniela Luz Ambrósio e Marco Túlio Alves da Silva pelo apoio e auxílio intelectual, que (mesmo distantes) sempre foram marcantes no desenvolvimento deste trabalho.

Aos servidores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial à Margareti Rossi (Secretaria), em nome de todos os colegas do Departamento de Ciências Biológicas, pelo generoso auxílio sempre que solicitado, e à Cláudia Molina, em nome das colegas da Seção de Pós-Graduação, pelo apoio e prontidão às solicitações.

Aos novos colegas de trabalho Adriano Palomino de Oliveira, Beatriz Buda Fuller, Celso Luis Borsato, Donizete Gonçalves de Oliveira e Fernando Luis Capeli, pela dedicação ao ensinar-me um novo ofício, e que, mesmo com as frequentes mudanças nas escalas de trabalho, sempre me apoiaram durante as etapas finais desta Tese.

Aos membros participantes da banca avaliadora de defesa desta Tese de Doutorado, Profa. Dra. Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira, Dr. Carlos Eduardo de Almeida, Prof. Dr. Marcos Takashi Obara e Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque pela valiosíssima contribuição para o fechamento da Tese, assim como aos membros suplentes Profa. Regina Maria Baretto Cicarelli, Dr. Walter Ceretti Júnior e Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior, pela disponibilidade e solicitude.

À vocês o meu reconhecimento e sincero agradecimento pelo incentivo e auxílio durante todas etapas desta Tese.

O desenvolvimento desta tese foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
(Processo 2010/50.355-1)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

12S	Fragmento ribossomal menor do DNA mitocondrial
16S	Fragmento ribossomal maior do DNA mitocondrial
18S	Fragmento ribossomal menor do DNA nuclear
28S	Fragmento ribossomal maior do DNA nuclear
A	Base nitrogenada adenina
BPP	Probabilidade Posterior na análise Bayesiana
C	Base nitrogenada citosina
COI	Fragmento mitocondrial citocromo oxidase I
CTA	Colônia de Triatomíneos de Araraquara
Cytb	Fragmento mitocondrial citocromo b
D2	Região D2 do fragmento ribossomal maior do DNA nuclear
DC	Doença de Chagas
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
F1 Universal(G3F1U)	Primer senso, que anela para todas as espécies do grupo
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
G	Base nitrogenada guanina
G1	Grupo composto por <i>R. neglectus</i> , <i>R. robustus</i> , <i>R. prolixus</i> e <i>R. pictipes</i>
G2	Grupo composto por <i>T. maculata</i> e <i>T. pseudomaculata</i>
G3	Grupo composto por <i>T. tibiamaculata</i> , <i>T. vitticeps</i> e <i>T. melanocephala</i>
G3R1Tt	Primer anti-senso que anela para <i>Triatoma tibiamaculata</i>
G3R2Tt	Primer anti-senso que anela para <i>Triatoma tibiamaculata</i>
G3R3Tv	Primer anti-senso que anela para <i>Triatoma vitticeps</i>
G3R4Tm	Primer anti-senso que anela para <i>Triatoma melanocephala</i>
G3R5Tm	Primer anti-senso que anela para <i>Triatoma melanocephala</i>
h	hora
HIV/Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
ITS1	Espaçador interno transcrito I
ITS2	Espaçador interno transcrito II
Kb	kilobase (1000 bases)
Km	Kilometro
M1, M2 e M3	Populações de <i>Triatoma melanocephala</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mM	milimolar
mtDNA	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NA	Fragmento não adequado ao desenho de <i>primers</i> específicos
nDNA	ácido desoxirribonucleico nuclear
Nested PCR	Reação de amplificação em cadeia a partir do produto de outra PCR
ng	nanograma
°C	Gráus centígrados

OMS	Organização Mundial da Saúde
ONG	Organização não governamental
P	Peso molecular
pb	Pares de bases
PCR	Reação de amplificação em cadeia de polimerases de DNA utilizando um par de iniciadores
PCR–multiplex	Reação de amplificação em cadeia de polimerases de DNA utilizando iniciadores múltiplos
pH	potencial hidrogeniônico
Porcentagem de CG	porcentagem de citosina e guanina, grau de ligações de hidrogênio
<i>primer F</i>	Iniciadores senso (<i>Forward</i>)
<i>primer R</i>	Iniciadores anti-senso (<i>Reverse</i>)
<i>primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores de amplificação
R6 Universal	<i>Primer</i> anti-senso que anela para todas as espécies do grupo
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Base nitrogenada timina
Tab, Tabs	Tabela (s)
TM	Temperatura na qual metade das moléculas de DNA estão pareadas
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo
UV	Radiação ultravioleta
V	volt
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
µL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da DC no mundo, com ênfase na transmissão vetorial da infecção por *T. cruzi*.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose (1%) do DNA genômico extraído de 54 exemplares de Triatominae avaliados.

Figura 3: Produto da PCR relativo ao fragmento Cytb com cerca de 750 pb para as espécies *R. pictipes* (43 e 46); *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26, 44 e 45); *R. robustus* (35-42); *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-05, 08-09, 15-16, 21 e 23); *T. melanocephala* (29-33); *T. tibiamaculata* (47-49); *T. vitticeps* (51-53).

Figura 4: Produto da PCR relativo ao fragmento 16S com cerca de 450 pb para as espécies *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26 e 44); *R. pictipes* (43 e 46) (A); *R. robustus* (35-42); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54) (B); *T. melanocephala* (29-34) (C).

Figura 5: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento COI com cerca de 700 pb para as espécies *R. pictipes* (43 e 46); *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26, 44 e 45); *R. robustus* (35-42); *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 15-17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 6: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento ITS1 com cerca de 1.100 pb para as espécies *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 16, 17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34, 43-44); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 7: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento ITS2 com cerca de 900 pb para as espécies *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 16, 17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34, 43-44); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 8: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento Itm para as espécies *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 16, 17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34, 43-44); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 9: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento COI (598 pb) para o G1 e de sequências disponíveis no GenBank®.

Figura 10: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento 16S (316 pb) para o G1 e de sequências disponíveis no GenBank®.

Figura 11: Alinhamento das sequências do fragmento Cytb (369 pb) para o G1 e de sequências disponíveis no *GenBank*®.

Figura 12: Filograma filogenético (NJ) gerado pelo programa *MEGA 5.05* e baseado no alinhamento do fragmento 16S do G1.

Figura 13: Filograma filogenético (NJ) gerado pelo programa *MEGA 5.05* e baseado no alinhamento do fragmento Cytb do G1.

Figura 14: Produto da PCR-multiplex relativo ao fragmento Cytb, com quatro padrões distintos de bandas, sendo um para cada uma das seguintes espécies: *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. pictipes*.

Figura 15: Alinhamento das sequências das espécies do G2, relativas ao fragmento 16S, que se encontram disponíveis em banco de dados.

Figura 16: Alinhamento das sequências das espécies do G2, relativas ao fragmento 12S, que se encontram disponíveis em banco de dados.

Figura 17: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento COI (646 pb) para o G2.

Figura 18: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento Cytb (642 pb) para o G2.

Figura 19: Alinhamento das sequências das espécies do G3, relativas ao fragmento 12S, que se encontram disponíveis em banco de dados.

Figura 20: Alinhamento das sequências das espécies do G3, relativas ao fragmento COI, que se encontram disponíveis em banco de dados.

Figura 21: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento 16S (440 pb) para o G3 e de sequências disponíveis no *GenBank*®.

Figura 22: Filograma filogenético (NJ) gerado pelo programa *MEGA 5.05* e baseado no alinhamento do fragmento 16S do G3.

Figura 23: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R6, com 258 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 24: Produto da *Nested PCR* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R1, com um fragmento de 120pb (esperado) e outro em torno de 300 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 25: Produto da *Nested PCR* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R2, com um fragmento de 211pb e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29 e 31); *T. tibiamaculata* (47 e 49); *T. vitticeps* (51 e 53).

Figura 26: Produto da *Nested PCR* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R3, com um fragmento de 243pb (esperado) e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 27: Produto da *Nested PCR* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R4, com um fragmento de 211pb (esperado) e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 28: Produto da *Nested PCR* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R5, com um fragmento de 211pb (esperado) e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

Figura 29: Produto da *Nested PCR-multiplex* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R2, R3 e R4, para as espécies *T. melanocephala* (29 e 31); *T. tibiamaculata* (47 e 49); *T. vitticeps* (51 e 53).

Figura 30: Produto da *Nested PCR-multiplex* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R2, R3 e R4, para as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps*, *T. brasiliensis*, *T. lenti* e *T. sherlocki*.

Figura 31: Mapa da distribuição das espécies *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, com enfoque nas populações de *T. melanocephala* (M1, M2 e M3).

Figura 32: Mapa da distribuição das espécies *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, com enfoque nas populações de *T. melanocephala* (M1, M2 e M3).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos exemplares de triatomíneos utilizados para obtenção das sequências e teste dos *primers* desenhados.

Tabela 2: Número de sequências disponíveis no *GenBank*[®] para cada espécie, durante as etapas iniciais do trabalho e os novos fragmentos propostos para análise (x).

Tabela 3: Fragmentos avaliados para cada um dos grupos.

Tabela 4: Código das sequências retiradas do GenBank e número das colônias (CTA) dos exemplares utilizados para o sequenciamento.

Tabela 5: Resultado da avaliação da PCR-multiplex relativos às espécies do grupo G1. Os *primers* diagnósticos relativos ao fragmento Cytb apresentaram padrões de amplificação distintos para cada espécie.

Tabela 6: Resultado da análise dos *primers* desenhados para o fragmento 16S relativo ao G3. Pares de bases (pb); Temperatura de *melting* (TM).

Tabela 7: Resultado da avaliação da *Nested Multiplex PCR* com os *primers* diagnósticos desenhados (F1 + R2 + R3 + R4) referentes às espécies do grupo G3 e outras espécies consideradas no subcomplexo *T. brasiliensis*. Os *primers* diagnósticos relativos ao fragmento 16S apresentaram padrões de amplificação distintos para cada espécie.

Tabela 8: Códigos de acesso dos fragmentos mitocondriais (16S, Cytb e COI) para os triatomíneos utilizados na reconstrução filogenética. As espécies foram divididas em grupos de acordo com a os dados recuperados nas análises (Figura 30).

Tabela 9: Distância genética (em porcentagem) entre as espécies avaliadas na reconstrução filogenética (Distância-p), com base em cada um dos fragmentos de gene concatenados (16S, Cytb e COI).

SUMÁRIO/ÍNDICE

Capítulo I – Tese de Doutorado

Resumo

Abstract

I. Introdução	21
I.1 – Doenças negligenciadas	22
I.2 – Doença de Chagas	24
I.3 – Insetos vetores do <i>Trypanosoma cruzi</i> – Triatomíneos	29
I.4 – Sistemática e biologia molecular de Triatominae	32
II. Objetivos	34
II.1 – Objetivos gerais	34
II.2 – Objetivos específicos	34
III. Material e Métodos	35
III.1 – Exemplares utilizados	35
III.2 – Extração do DNA e amplificação dos fragmentos	37
III.3 – Sequenciamento do DNA amplificado	38
III.4 – Alinhamento das sequências e análise filogenética	38
III.5 – Desenho e teste dos <i>primers</i> específicos	40
III.6 – PCR-multiplex	41
IV. Resultados	42
IV.1 – Análise inicial das sequências disponíveis em banco de dados	42
IV.2 – Extração do DNA genômico	42
IV.3 - Amplificação (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse	43
IV.4 – Sequenciamento, alinhamento e análise dos dados	50
IV.4.1 – G1	53
IV.4.1.1 Alinhamento das sequências	53
IV.4.1.2 – G1 - Análise filogenética	56
IV.4.1.3 – G1 - PCR-multiplex teste dos <i>primers</i>	58
IV.4.2 – G2	60
IV. 4.2.1 – Sequenciamento do DNA amplificado e alinhamento das sequências	60
IV.4.3 – G3	64
IV. 4.3.1 – Sequenciamento do DNA amplificado e alinhamento das sequências	64

IV. 4.3.2 – G3 - Análise filogenética para o desenho de primers	66
IV. 4.3.3 – G3 - Desenho e teste dos <i>primers</i> específicos	66
IV. 4.3.4 – G3 - PCR-multiplex	74
IV. 4.3.5 – Análise filogenética das espécies <i>T. melanocephala</i> , <i>T. tibiamaculata</i> e <i>T. vitticeps</i>	77
V. Discussão	84
VI. Conclusões	92
VII. Referências Bibliográficas	93

Capítulo II – Artigos

Artigos publicados

- Danila B. Carvalho, Carlos E. Almeida, Cláudia S. Rocha, Sueli Gardim, Vagner J. Mendonça, Aline R. Ribeiro, Zulimar C. P. V. T. Alves, Kellem T. Ruellas, Alan Vedoveli, João A. da Rosa. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center and the risk of Chagas disease transmission by residential invasions in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. *Acta Tropica*, v. 130, p. 35–38, 2014.
- Sueli Gardim, Cláudia S. Rocha, Carlos E. Almeida, Daniela M. Takiya, Marco T. A. da Silva, Daniela L. Ambrósio, Regina M. B. Cicarelli, and João A. da Rosa. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 89(4):. 766–774, 2013.
- João A. da Rosa, Cláudia S. Rocha, Sueli Gardim, Mara C. Pinto, Vagner J. Mendonça, Júlio C.R. Ferreira-Filho, Elaine O.C. Carvalho, Luís M.A. Camargo, Jader de Oliveira, Juliana D. Nascimento, Mário Cilense, Carlos E. Almeida. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62–76, 2012.
- João A. Rosa, Vagner J. Mendonça, Cláudia S. Rocha, Sueli Gardim, Mario Cilense. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 105(3): 286-292, 2010.

Artigo aceito para publicação

- Sueli Gardim, Carlos E. Almeida, Daniela M. Takiya, Jader Oliveira, Renato F. Araújo, Regina M.B. Cicarelli, João A. da Rosa. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision of triatomines. *Infection Genetics and Evolution* (In Press).

CAPÍTULO I

TESE DE DOUTORADO

RESUMO

A doença de Chagas apresenta como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, cujos vetores pertencem à subfamília Triatominae. Triatomíneos são insetos sugadores de sangue (ordem Hemiptera e família Reduviidae), distribuídos, principalmente, na região Neotropical e, epidemiologicamente, se destacam espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. O gênero *Rhodnius* apresenta alta semelhança morfológica entre suas espécies e o gênero *Triatoma* é o mais diversificado, porém ambos foram agrupados em complexos de espécies, com base em semelhanças morfológicas, distribuição geográfica, abordagens genéticas, entre outros. Para alguns complexos de espécies os caracteres morfológicos não são suficientes para a identificação específica correta. Portanto, as ferramentas moleculares são apresentadas como uma alternativa útil para a identificação de espécies relacionadas. Este estudo visou contribuir para a identificação de três grupos de espécies de triatomíneos, por meio do desenho de novos primers diagnósticos para compor uma multiplex-PCR: o primeiro grupo é composto por quatro espécies de *Rhodnius*: *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. prolixus* e *R. pictipes*; os segundo e terceiro grupos apresentam espécies do gênero *Triatoma*: *T. maculata* e *T. pseudomaculata*; e *T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* e *T. vitticeps*. Além disso, avaliaram-se as relações filogenéticas com as sequências resultantes. Após extração do DNA mitocondrial (16S, Cytb e COI) e DNA nuclear (ITS1 e ITS2) genes foram amplificados e sequenciados. Para diagnosticar as espécies do gênero *Rhodnius*, os primers referentes ao Cytb foram eficientes para compor uma multiplex-PCR, que se separou *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. pictipes* e *R. robustus*. Da mesma forma, os primers desenhados para o fragmento 16S distinguiram *T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* e *T. vitticeps*. Para *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, nenhum dos primers testados apresentou resultado satisfatório. As relações filogenéticas mostraram a não-monofilia do subcomplexo *T. brasiliensis*. A parafilia do gênero *Triatoma* também foi reforçada pelo posicionamento das espécies silvestres (*T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* e *T. vitticeps*), junto às dos gêneros *Dipetalogaster*, *Meccus*, *Meptraia* e *Panstrongylus*, com um forte suporte dos cladogramas (BPP = 99%). Assim, conclui-se que as reações de PCR-multiplex foram eficientes no diagnóstico das espécies *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. robustus*, bem como para as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*, mas não distinguiu *T. pseudomaculata* e *T. maculata* com base nos fragmentos avaliados. Análise Bayesiana indicou *T. vitticeps* como espécie irmã de *T. melanocephala* com alto suporte (BPP = 100%) e *T. tibiamaculata* como irmã de *P. megistus* (BPP = 99%). Esses resultados destacaram a necessidade de revisão nos gêneros da tribo Triatomini.

ABSTRACT

Chagas disease presents as etiologic agent the protozoan *Trypanosoma cruzi*, whose vectors belong to the Triatominae subfamily. Triatomine bugs are bloodsucking insects (belonging to the Hemiptera order and Reduviidae family), which are distributed predominantly at the Neotropical region and epidemiologically stand the species belong *Panstrongylus*, *Rhodnius* and *Triatoma* genera. The *Rhodnius* genus shows high morphological similarity among their species, as the *Triatoma* genus is the most numerous, however both were grouped into species complexes, according to morphological similarities and geographical distribution, genetic approaches, and others. For some species complexes morphological characters are not enough to make the correct specific identification. Therefore, molecular tools are presented as an useful alternative to identify closely related species. This study aimed to contribute to the identification of three groups of Triatominae species by the design of new diagnose primers for multiplex-PCR: the first group consists of four species of *Rhodnius* genus: *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. prolixus* and *R. pictipes*; the second and third groups comprise *Triatoma* species: *T. maculata*, and *T. pseudomaculata*; and *T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* and *T. vitticeps*. Additionally, we evaluated the phylogenetic relationships with the resulting sequences. After DNA extraction, mitochondrial (16S, Cytb and COI) and nuclear DNA (ITS1 and ITS2) genes were amplified and sequenced. To diagnose *Rhodnius* species the primers for the fragment of Cytb were efficient, by using a multiplex-PCR that separated *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus* and *R. pictipes*. Similarly, the primers designed for the 16S fragment distinguished *T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* and *T. vitticeps*. For *T. maculata* and *T. pseudomaculata* no one of the tested candidate primers showed satisfactory results. In the *T. brasiliensis* subcomplex the phylogenetic relationships brought up the non-monophyly of *T. brasiliensis* subcomplex. The paraphyly of *Triatoma* was also reinforced by the placement of the sylvatic species (*T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* and *T. vitticeps*) with *Dipetalogaster*, *Meccus*, *Meptraia*, and *Panstrongylus*; with a strong clade support (BPP = 99%). We concluded that the multiplex-PCR reactions were very efficient in the diagnosis of the species *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. robustus*, as well as *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps* species, but it was not possible to distinguish *T. pseudomaculata* and *T. maculata* evaluated based on the fragments. The *T. vitticeps* was recovered as sister to populations of *T. melanocephala* with high support (BPP=100%). Furthermore, Bayesian inference recovered *T. tibiamaculata* as sister to *P. megistus* with strong support (BPP=99%). Overall phylogenetic results highlighted the need of generic revision in Triatomini tribe.

I. INTRODUÇÃO

A descoberta da Tripanossomíase Americana (TA), em 1909, por Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas foi um marco na medicina tropical. Todo o ciclo da doença foi descrito pelo próprio Chagas, no município de Lassance, no Estado de Minas Gerais. Desde a descrição do agente etiológico, um protozoário flagelado, que recebeu o nome de *Trypanosoma cruzi* (em homenagem a Oswaldo Cruz), até mesmo o reconhecimento do vetor, inseto hematófago da ordem Hemiptera, na época, pertencente ao gênero “*Conorrhinus*” e atualmente conhecido como *Panstrongylus megistus*. Chagas também previu que os mamíferos presentes, tanto no ambiente peridomiciliar como no silvestre, eram possíveis reservatórios de *T. cruzi* (Chagas, 1909). E, assim, esse mal passou a ser conhecido também como doença de Chagas (DC), nome apresentado durante a Conferência da Academia Nacional de Medicina, em 1923, por Miguel de Oliveira Couto, então presidente da Academia (Begliomini, 2013).

Na transmissão da DC, destaca-se a participação de insetos hematófagos, pertencentes à subfamília Triatominae. Os triatomíneos se distribuem predominantemente pela região Neotropical, e epidemiologicamente se destacam as espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. O gênero *Panstrongylus* conta com 14 espécies, que são morfológicamente distintas entre si; *Rhodnius* apresenta grande semelhança morfológica entre suas 18 espécies e a identificação das mesmas é bastante complexa; o gênero *Triatoma* é o mais diversificado, com 71 espécies. Os gêneros *Rhodnius* e *Triatoma* foram subdivididos em complexos específicos de acordo com semelhanças morfológicas e distribuição geográfica (Galvão, 2003; Schofield e Galvão, 2009; Rosa et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Jurberg, et al., 2013).

Geralmente, apenas a avaliação de caracteres morfológicos, não se mostra suficiente para a correta identificação de todas as espécies dessa subfamília, ou mesmo seu agrupamento em gênero ou complexo. A avaliação de dados moleculares se apresenta como uma alternativa bastante útil para auxiliar na identificação de espécies morfológicamente próximas pertencentes à subfamília Triatominae. Dessa forma, este estudo visa avaliar as relações filogenéticas, contribuir para o aperfeiçoamento na identificação de nove espécies da subfamília Triatominae, por meio da avaliação de fragmentos do DNA mitocondrial e nuclear, bem como para o desenvolvimento de *primers* diagnósticos específicos, que agreguem uma *PCR-multiplex*.

I.1 – Doenças negligenciadas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta uma série de 20 patologias consideradas negligenciadas. Essas patologias, distribuídas principalmente nos países tropicais, atingem mais de um bilhão de pessoas, em aproximadamente 150 países e territórios. Dentre as doenças classificadas como negligenciadas pela OMS estão cisticercose, dengue e dengue hemorrágica, esquistossomose, filariose linfática e outras helmintíases, leishmaniose, raiva, tracoma e tripanossomíase americana (DC), entre outras. Essas doenças são geralmente endêmicas e estão basicamente associadas à população de baixa renda de países da África, Ásia e América Latina (WHO, 2009).

Por esse motivo, as grandes empresas farmacêuticas não mostram muito interesse na pesquisa, desenvolvimento e produção de medicamentos que melhorem a qualidade de vida dos indivíduos que apresentam uma ou mais dessas doenças. Assim, apesar do grande número de pessoas acometidas e que vivem em áreas de risco para a transmissão dessas

doenças, os esforços para a produção de novos fármacos poderiam não gerar lucro, por atingir, principalmente, países com economias enfraquecidas (WHO, 2009).

No entanto, em 2003, foi criada a “Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas” (DNDi), uma parceria entre a Organização não Governamental (ONG) Médicos Sem Fronteiras, o Instituto Pasteur (França), a Fiocruz (Brasil), o Ministério da Saúde da Malásia e os institutos de pesquisa clínica da Índia e do Quênia. Essa parceria é uma iniciativa para desenvolver novos tratamentos para doenças negligenciadas e produzir esses fármacos sem fins lucrativos. Além disso, a DNDi investe na capacitação de profissionais para pesquisa em países endêmicos e também conscientiza a população e os governos envolvidos, sobre vários aspectos do tratamento das doenças negligenciadas (DNDi, 2003).

Outras patologias como a síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), tuberculose e malária (que vem de encontro com o exposto, por receberem recursos consideráveis relativos à pesquisa e ao desenvolvimento de novos fármacos), podem ser agravadas quando concomitantes com uma ou mais doenças negligenciadas. Isso evidencia a necessidade de mais estudos integrados entre essas patologias, para que, futuramente, se possam estabelecer políticas de tratamento abrangentes, que considerem as variáveis biológicas e epidemiológicas desses extremos da saúde, mas que frequentemente se manifestam associados (WHO, 2009).

Nesse contexto destaca-se a DC, prevalente na América Latina e que acomete entre sete e oito milhões de pessoas no mundo. Dentre esses, dois a três milhões de casos ocorrem no Brasil, onde a maioria das pessoas infectadas encontra-se na fase crônica da doença (WHO, 2013; BRASIL, 2012).

Com relação ao tratamento da DC, apenas dois fármacos mostraram-se ativos contra o *T. cruzi*: o benzonidazol e o nifurtimox. Ambos são indicados durante a fase aguda da doença e pode apresentar vários efeitos colaterais. Na fase crônica, o tratamento etiológico

também é indicado, porém com uma chance de sucesso bastante inferior. Nesse momento, são efetivamente tratados os sintomas de cardiopatias e as alterações no sistema digestório, com o uso de antiarrítmicos, implantação de marca-passos e outros processos cirúrgicos (Coura e Cançado, 2009).

Alguns trabalhos também relacionam a DC à HIV/AIDS. Em 2009, Scapellato et al. discutem sobre a transmissão vertical da DC, quando apontaram a coinfeção da mãe por HIV, como um fator que poderia aumentar o risco da transmissão da DC para a criança. Recentemente, Hotez et al. (2012) comparou a situação atual da DC à “pandemia” de HIV/AIDS registrada nos anos 1980. Os autores levantaram alguns pontos importantes, como a falta de fármacos eficazes e disponíveis, o alto custo no tratamento, a transmissão por transfusão sanguínea e a discriminação dos grupos atingidos pela doença, no caso da DC, geralmente pessoas de baixa renda, agricultores e imigrantes. Esses são também os principais fatores que caracterizam a DC como uma doença negligenciada.

I.2 – Doença de Chagas

A forma mais comum de transmissão do protozoário *T. cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) está relacionada à infecção, por meio de fezes contaminadas de triatomíneos, deixadas próximo ao local da picada do inseto, durante seu repasto sanguíneo. Além da transmissão por meio das fezes dos vetores, a infecção pode ocorrer por vários mecanismos, como as transfusões sanguíneas, a infecção congênita pela via transplacentária, os acidentes laboratoriais, os transplantes de órgãos, e a transmissão oral, que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente, caldo de cana e de açaí (Lewinsohn, 2005; WHO, 2011).

Com relação à transmissão oral, em 2005, foram relatados às autoridades de saúde do Estado de Santa Catarina vinte e quatro casos (sendo três fatais) de febre hemorrágica, todos associados à ingestão de caldo de cana (BRASIL, 2008a). Estudos posteriores constataram a contaminação do caldo por *T. cruzi* e que caracterizam a fase aguda da DC, assim como as reações observadas (Steindel et al., 2008). Na região Norte do Brasil, entre 2005 e 2007, foi registrado um surto de transmissão de *T. cruzi* pelo consumo do suco de açaí, constando mais de cem ocorrências e oito óbitos. Em 2010, no município de Altamira no Estado do Pará, foram confirmados 43 casos relacionados à DC aguda, visto que, em 2009, já haviam sido registrados 236 casos confirmados (94% das notificações nacionais segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan) no mesmo Estado. Dessa forma, essa doença é um problema de saúde pública que persiste, sendo que a transmissão oral, atualmente, requer especial atenção junto ao controle dos vetores (BRASIL, 2008b).

A transmissão vetorial é de grande importância epidemiológica, pois é responsável pela maioria dos novos casos nas regiões endêmicas. Há estimativas que entre sete e oito milhões de pessoas estejam infectadas, com mais de 25 milhões vivendo em áreas de risco, o que resulta em cerca de dez mil mortes anuais. No Brasil, em torno de dois a três milhões de pessoas devem estar infectadas no Brasil (WHO, 2011, 2013; BRASIL, 2012). No entanto, podemos destacar também a transmissão por meio de transfusões sanguíneas, responsáveis pela disseminação da doença fora da América Latina (norte das Américas, Europa, Ásia e Oceania) (Figura 1).

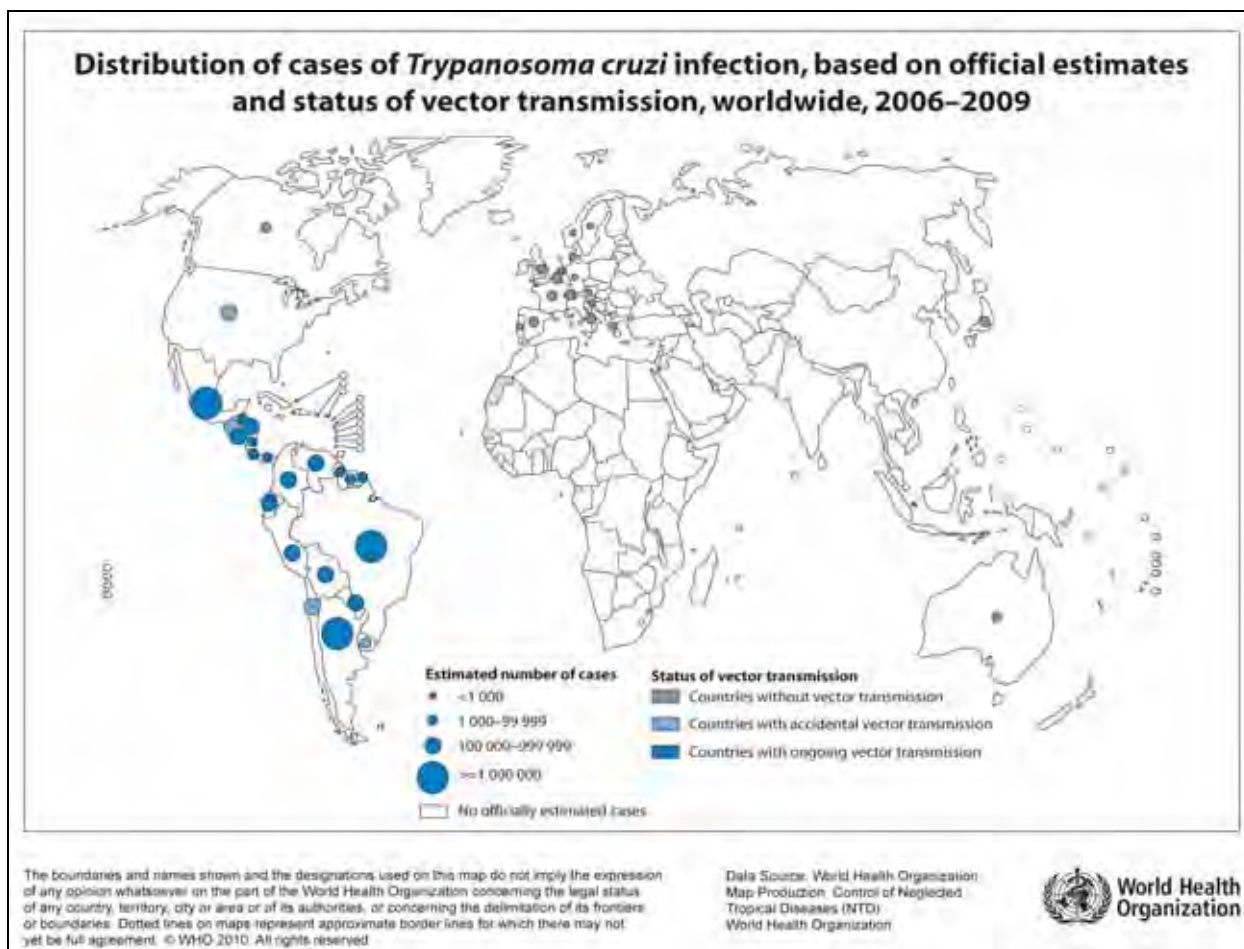


Figura 1: Distribuição da DC no mundo, com ênfase na transmissão vetorial da infecção por *T. cruzi*.

Os vetores da DC são insetos hematófagos pertencentes ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera e Família Reduviidae, sendo que todas as espécies da subfamília Triatominae são potencialmente transmissoras do protozoário *T. cruzi*. No entanto, apenas algumas espécies participam efetivamente desse ciclo de transmissão, pois muitas espécies de triatomíneos habitam o ambiente silvestre, sem notificações de domiciliação. Assim, pode-se observar claramente uma divisão nos ciclos de transmissão do parasito: um ciclo silvestre e um ciclo doméstico (Forattini, 1980; Argolo et al., 2008).

De forma geral, todos os vertebrados podem suprir as necessidades alimentares dos triatomíneos. No entanto, no ambiente silvestre, existem várias espécies de mamíferos que podem servir como reservatórios do flagelado *T. cruzi*. Já outras classes de vertebrados, como

aves, répteis, anfíbios e peixes, são refratárias à infecção por esse protozoário (Torres e Dias, 1982; Deane et al., 1984; Noireau et al., 2009).

Pelas características de disseminação, a DC se apresenta como uma antropozoonose típica de ambientes rurais e periurbanos. Assim, as precárias condições de moradia e de saneamento, como irregularidades nas construções camponesas e a falta de saneamento do meio, favorecem a formação de colônias de triatomíneos no peridomicílio e também no interior das residências (intradomicílio). Dessa forma, se verifica um fenômeno conhecido como domiciliação dos triatomíneos, no qual, estes invadem e se refugiam próximo aos domicílios em busca de abrigo e alimento, onde tendem a formar colônias no intra e peridomicílio (Dias e Schofield, 1998).

A notória ação antrópica sobre os ambientes naturais gera uma crescente redução nos ambientes silvestres. Isso ocorre, principalmente, para exploração de recursos naturais e/ou aumento das áreas habitáveis e de cultivo. Todas essas ações favorecem o desalojamento de populações nativas de triatomíneos e as forçam à buscarem um novo habitat. A expansão da tripanossomíase americana acompanha o processo de colonização, e nota-se em paralelo a adaptação dos triatomíneos às habitações humanas. A domiciliação dos vetores configura os ciclos domésticos e peridomésticos de *T. cruzi*.

No ciclo peridoméstico, os vetores interagem com os animais que convivem em torno das habitações humanas, alimentando-se do sangue de aves e mamíferos de criação. Já o ciclo doméstico é caracterizado pela presença de triatomíneos dentro das residências, quando esses vetores utilizam principalmente o sangue humano como fonte alimentar (Vinhaes e Dias, 2000; Peñaranda-Carrillo et al., 2002; Tartarotti et al., 2004; Oliveira e Silva, 2007). No Brasil, o contato do ser humano com o ambiente silvestre, confere possibilidade de domiciliação às espécies mais adaptadas de triatomíneos ao ambiente antrópico, como *T. infestans* (possível reemergência como vetor – veja certificação a seguir), *T. brasiliensis*

(Nordeste), *T. pseudomaculata* (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) *T. sordida* (Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste) e *P. megistus* (Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) (Forattini, 1980; Schofield et al. 1999; Diotaiuti, 2000; Dias, 2002; Gurgel-Gonçalves et al., 2013).

Após a infecção por *T. cruzi*, a doença pode evoluir passando por uma fase aguda e uma fase crônica, na qual podem se manifestar, em uma parcela da população infectada, as principais patologias cardíacas e digestórias. Em alguns casos, principalmente em áreas endêmicas pode-se notar uma forma indeterminada da doença (50 a 70 % dos casos), caracterizada por uma forma latente, com desenvolvimento assintomático desde o início da infecção, que pode evoluir para a fase crônica. O medicamento utilizado para o tratamento, o benzonidazol, encontra-se disponível gratuitamente no Sistema Único de Saúde, no entanto, apresenta eficácia apenas quando administrado durante a fase aguda da doença. Esse medicamento é atualmente produzido no Brasil pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e na Argentina (à partir de 2012), e apresenta certo grau de toxicidade, o que pode gerar muitos efeitos adversos aos pacientes. Além disso, durante a fase indeterminada (momento em que se encontra a grande maioria dos indivíduos infectados) e a fase crônica da doença, essa medicação não apresenta a mesma eficiência, e nessas fases devem-se avaliar caso a caso, as infecções e a melhor forma de tratamento. Nos casos mais avançados da doença se recomenda a utilização de antiarrítmicos e/ou implantação de marca-passos, além de procedimentos cirúrgicos corretivos, para minimizar os distúrbios relacionados às alterações no sistema digestório (Coura e Cançado, 2009).

A falta de um tratamento eficaz contra a DC e a alta possibilidade de colonização e recolonização intradomiciliar pelos vetores, em algumas áreas, demonstram a grande dificuldade no controle da doença. Assim sendo, atualmente o controle vetorial em áreas endêmicas apresenta-se como a medida mais eficaz no combate à transmissão de *T. cruzi* (Coura e Cançado, 2009). No Brasil, os programas de controle estão focados nas espécies

secundárias, uma vez que aos nove de junho de 2006, o Ministério da Saúde recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *T. infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde. Outros países da América Latina também receberam esta certificação como é o caso do Uruguai e Chile, e regiões do Paraguai e Argentina. (Schofield et al. 1999; Dias, 2002; Abad-Franch et al., 2013).

Esta certificação não representa o controle efetivo da transmissão vetorial da doença de Chagas no país, mas sim a interrupção da transmissão da doença por meio do vetor *T. infestans*. Dessa forma, o controle vetorial deve ser revisto e, periodicamente, redimensionado, juntamente com programas de melhorias nas habitações rurais, fim de manter um índice de infestação domiciliar que inviabilize a transmissão em área com predominância de espécies consideradas secundárias, como *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e outras (Dias, 2002; Abad-Franch et al., 2013).

A comunidade científica, por meio de estudos do agente etiológico da DC e de seus vetores, tem contribuído com a implantação, sustentação e avaliação das políticas de controle vetorial (Dias, 2007). Vários estudos demonstram o elevado custo do tratamento das pessoas com a DC em áreas endêmicas. Dessa forma, maiores investimentos na sustentação dos programas de prevenção poderiam minimizar os custos no tratamento da doença, gerando melhores retornos econômicos e sociais (Brener, 1986; Schmunis e Dias, 2000; Dias, 2002; Vieira, 2002; Abad-Franch et al., 2013).

I.3 – Insetos vetores do *Trypanosoma cruzi* – Triatomíneos

Alguns grupos de triatomíneos apresentam muitas semelhanças morfológicas, o que dificulta a correta discriminação dos táxons mais próximos. Vários estudos apontam a

proximidade morfológica e as dificuldades na identificação de espécies dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Entre *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*, bem como entre *R. pictipes*, *R. brethesi* e *R. ecuadorensis*, além da grande variedade encontrada em meio às populações de *R. robustus* de diferentes regiões (Monteiro et al., 2000, 2002, 2003; Naegele, et al., 2006).

O gênero *Triatoma* é o mais diversificado e suas espécies estão subdivididas em grupos, complexos e subcomplexos, com base em semelhanças morfológicas, distribuição geográfica, possibilidade de hibridação e proximidade molecular. Por possibilitar várias abordagens de acordo com o parâmetro avaliado, até o momento não há consenso para o agrupamento das espécies desse gênero em grupos, complexos e subcomplexos (Usinger et al., 1966; Lent e Wygodzinsky, 1979; Carcavallo e Martinez, 1985; Schofield e Galvão, 2009).

Assim, podemos notar que apenas a análise de parâmetros morfológicos, não se mostra a metodologia mais adequada para esclarecer todas as questões taxonômicas. Esse é o caso das espécies do gênero *Rhodnius* (Costa et al., 1997; Monteiro et al., 2001; Jurberg, 2003) e de alguns subcomplexos como *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *T. rubrovaria*, este último com até quatro morfotipos com as principais variações cromáticas observadas no pronoto, para a espécie que denomina o grupo (Almeida et al., 2002; Pacheco et al., 2003).

Dessa forma, podemos observar vários pontos de discussão, como a homogeneidade entre as populações de *T. sordida* (Panzeria et al., 1997) e o fato de *T. garciabesi*, espécie morfológicamente semelhante a *T. sordida*, ter sido considerada uma subespécie até sua revalidação em 1998, por Jurberg et al. Atualmente o subcomplexo *T. sordida* agrupa as espécies *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* (Canale et al., 2000; Shofield e Galvão, 2009).

As espécies do subcomplexo *T. brasiliensis*, que apresentam seu centro de dispersão no Nordeste do Brasil (Forattini, 1980) apresentam quatro padrões de coloração no pronoto, pernas e asas, cada um com distribuição em áreas distintas (Costa et al., 1997, 1998, 2002; Monteiro et al., 2004; Borges et al., 2005). Devido às evidências morfológicas e genotípicas, o táxon *T. brasiliensis* (Neiva, 1911) sofreu revisão taxonômica e atualmente é composto por duas subespécies e duas novas espécies: *T. brasiliensis brasiliensis* (Neiva, 1911); *T. brasiliensis macromelasoma* (Galvão, 1956), *T. brasiliensis melanica*, redescrita como *T. melanica* por Costa e colaboradores (2006) - e *Triatoma brasiliensis de Juazeiro* (Costa et al., 1997), descrita como *T. juazeirensis* (Costa e Felix, 2007).

Essas espécies foram alocadas em um grupo monofilético junto a *T. sherlocki*, com base na análise de sequências de fragmentos mitocondriais – Cytb e 16S (Mendonça et al., 2009). Em uma tentativa de reunir a maioria das classificações propostas, por meio de dados moleculares, morfológicos e geográficos, Schofield e Galvão (2009) agruparam no subcomplexo *T. brasiliensis* as seguintes espécies: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochii* e *T. sherlocki*. Redescrita por Sherlock e Guitton (1980), *T. melanocephala* é uma espécie rara, que apresenta semelhanças morfológicas com *T. vitticeps* e *T. chagasi*, e, por esse motivo, foi considerada sinônima de *T. vitticeps* por muitos anos (Lent e Wygodzinsky, 1979; Alevi et al., 2012). Assim, Schofield e Galvão (2009) também incluíram provisoriamente essa espécie no subcomplexo *T. brasiliensis* juntamente com *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*, com base em semelhanças morfológicas, no entanto, apontaram que os dados moleculares não apresentaram evidências de proximidade com outros membros desse subcomplexo.

Várias espécies de triatomíneos apresentam grande importância epidemiológica, como é o caso de *R. prolixus* relacionado à transmissão do flagelado *T. cruzi* em diversos países da América do Sul e Central; *R. robustus* e *R. pictipes* geralmente encontrados em

palmeiras e envolvidos com a transmissão oral na Amazônia brasileira; *T. maculata* vetor da doença de Chagas em Roraima; *T. pseudomaculata* atua na transmissão do parasito no nordeste brasileiro; *T. tibiamaculata* foi relacionado ao surto de transmissão oral em Santa Catarina e na Bahia, onde esta espécie também vem sendo encontrada em residências de alto padrão e, geralmente, acompanhando as áreas de domiciliação de *P. megistus*. *Triatoma vitticeps*, até o momento, não se apresenta como um vetor real da doença de Chagas, mas recentemente casos de transmissão humana de doença de Chagas foram atribuídos a este vetor no Estado do Rio de Janeiro por meio da colonização de residências (Gonçalves et al., 1988; Gonçalves et al., 2000; dos Santos et al., 2005; Lorosa et al., 2008). Por outro lado, *T. melanocephala* parece permanecer exclusivamente no ambiente silvestre no Nordeste semi-árido do Brasil. (Galvão et al., 2003; Gurgel-Gonçalves et al., 2012)

I.4 – Sistemática e biologia molecular de Triatominae

Com relação à sistemática dos triatomíneos, se faz necessário o desenvolvimento de outros e novos parâmetros para a avaliação de espécies próximas. Os precursores na avaliação de aspectos moleculares estudaram os padrões isoenzimáticos dos triatomíneos (Actis et al., 1964; Jurberg et al., 1998; Noireau et al., 2002), e nos últimos anos, vários estudos visam esclarecer dúvidas relacionadas à filogenia dos triatomíneos (García et al., 2001; Hypsa et al., 2002; Mendonça et al., 2009).

Vários estudos têm auxiliado a elucidar questões filogenéticas sobre os triatomíneos sul-americanos, usando marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear (nDNA). Os marcadores mais utilizados do mtDNA são os fragmentos 12S, 16S, citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (Cytb) e do nDNA, ITS1, ITS2, 18S e a

porção D2 do fragmento 28S (Bargues et al., 2000; Hypsa et al., 2002; Tartarotti e Ceron, 2005; Martinez et al., 2006).

O agrupamento dos triatomíneos pode ser baseado em diferentes argumentos. As relações filogenéticas e a formação de complexos específicos da subfamília Triatominae, ainda são muito discutidos, e, até o momento, nem todas as espécies foram avaliadas com base em marcadores moleculares, o que pode gerar enganos e controvérsias (Lent e Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 1999; Hypsa et al., 2002; Schofield e Galvão, 2009).

Com o intuito de diferenciar *R. prolixus* e *R. robustus*, Pavan e Monteiro (2007) avaliaram o alinhamento de sequências de diferentes haplótipos do fragmento Cytb dessas espécies. Esse alinhamento apontou sítios polimórficos, que propiciaram o desenho de novos oligonucleotídeos iniciadores de amplificação (*primers*) e, assim, separaram os grupos por meio da amplificação de fragmentos com tamanhos distintos, utilizando a técnica de *PCR-multiplex*.

A identificação dos táxons desses vetores é de grande relevância epidemiológica e taxonômica, pois a correta identificação de insetos pertencentes à subfamília Triatominae e o mapeamento das áreas de risco podem beneficiar as iniciativas de controle vetorial (Almeida et al., 2008).

No entanto, como referido anteriormente, há ainda uma grande dificuldade na identificação de espécies da subfamília Triatominae. Assim, este trabalho tem como objetivo investigar e contribuir com a identificação de nove espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*, por meio do desenvolvimento de marcadores diagnósticos, com a finalidade de facilitar a distinção de espécies morfologicamente semelhantes.

II. OBJETIVOS

II.1 – Objetivos gerais

Identificar novos marcadores diagnósticos, para auxiliar na identificação específica de nove espécies da subfamília Triatominae.

Avaliar as relações filogenéticas entre os membros dos complexos de espécies propostos por diferentes autores.

II.2 – Objetivos específicos

Sequenciar e analisar os fragmentos do DNA mitocondrial e nuclear para nove espécies dos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius*: *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. prolixus*, *R. robustus*, *T. maculata*, *T. melanocephala*, *T. pseudomaculata*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Propor novos *primers* com base nos polimorfismos encontrados a fim de obter fragmentos com tamanhos distintos para cada espécie e avaliar o seu perfil de amplificação.

Propor um arranjo de *primers* para compor uma *PCR-multiplex* a ser empregada no diagnóstico específico das espécies avaliadas em cada um dos grupos: G1 - *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. prolixus* e *R. pictipes*; (G2) *T. maculata* e *T. pseudomaculata*; (G3) *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* e *T. melanocephala*.

Avaliar a sensibilidade e a especificidade da *PCR-multiplex* proposta.

Avaliar filogeneticamente espécies da subfamília Triatominae, em especial *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, com base nas sequências dos marcadores mitocondriais 16S, Cytb e COI.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 – Exemplos utilizados.

No presente estudo, foram avaliados três agrupamentos de espécies de Triatominae, morfologicamente semelhantes. O primeiro (G1) é composto pelas espécies *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. prolixus* e *R. pictipes*; o seguinte (G2) por *T. maculata* e *T. pseudomaculata*; e, por fim, (G3) *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* e *T. melanocephala*. Os exemplares de triatomíneos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos de DNA foram retirados de colônias identificadas como “Colônia de Triatomíneos de Araraquara” (CTA), depositadas e mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Araraquara (FCF-UNESP/Araraquara), sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa (Tabela 1).

As etapas que envolvem metodologias moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos, do Departamento de Ciências Biológicas, da FCF-UNESP/Araraquara. O sequenciamento dos fragmentos foi realizado em dois locais distintos: Departamento de Física e Informática do Instituto de Física de São Carlos – USP e Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

Tabela 1: Identificação dos exemplares de triatomíneos utilizados para obtenção das sequências e teste dos *primers* desenhados.

Grupo	Espécie	Colônia (CTA)	Procedência	Data de início da colônia	Número da amostra
G1	<i>R. neglectus</i>	055	Guaíra – SP	08/03/1982	24, 25, 26
		057	Frutal – MG	23/05/1983	18, 19, 20
		058	Pitangueiras - SP	14/06/1982	44
		063	Jucurutú - RN	23/05/1983	10, 11,12
		067	Frutal - MG	23/05/1983	45
	<i>R. robustus</i>	083	SI	02/02/1983	35, 36
		084	SI	08/03/1983	37, 38
		085	SI	03/06/1982	39, 40
		086	Madre de Dios - Peru	03/06/1982	41, 42
	<i>R. prolixus</i>	076	Bogotá - Colômbia	02/02/1983	55, 56
		079	Edoguarica - Venezuela	05/09/1999	57, 58
	<i>R. pictipes</i>	071	Jacundá - PA	23/05/1983	59, 60
		072	Belém - PA	18/11/1998	61, 62
	G2	<i>T. maculata</i>	140	Belém - PA	12/06/1997
141			Venezuela	25/10/1984	27, 28
143			Boa Vista - RR	25/10/2006	01, 02, 03
<i>T. pseudomaculata</i>		152	Orós – CE	21/02/1984	15, 16, 17
		154	Pecintos - PB	02/07/1982	04, 05, 06
		155	Teofilândia - BA	21/08/1984	21, 22, 23
		158	Messias Targino - RN	25/10/1984	07, 08, 09
G3		<i>T. melanocephala</i>	219 M1	Jequié – BA	08/10/2009
	220 M2		Poções – BA	17/11/2009	33, 34
	221 M3		Bom Jesus da Serra-BA	26/04/2010	31, 32
	<i>T. tibiamaculata</i>	195	Mogi-Guaçu – SP	17/06/1986	47, 48
		196	SI	21/02/1984	49, 50
	<i>T. vitticeps</i>	198	Guarapari - ES	01/11/1979	51, 52
		199	MG	25/07/1968 Sesa-09/08/82	53, 54

Nota: SI – Sem informações relativas à procedência. As abreviações em letra maiúscula se referem às siglas oficiais dos Estados brasileiros.

III.2 – Extração do DNA e amplificação dos fragmentos

O DNA total foi extraído utilizando-se a metodologia de extração com fenol-clorofórmio, com base no protocolo proposto por Bargues e Mas-Coma (1997). Para isso, utilizou-se a musculatura das pernas de exemplares adultos. Esse material foi escolhido por ser um tecido livre de microrganismos contaminantes e simbiontes.

O fragmento de DNA amplificado foi selecionado de acordo com a especificidade e velocidade de evolução do gene, bem como a disponibilidade de sequências em banco de dados e seu desempenho em avaliações filogenéticas anteriores. Os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos foram CTC CTG TTT AAC AAA AAC AT e AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA para 16S (Lyman et al., 1999); GGA CGW GGW ATT TAT TAT GGA TC e GCW CCA ATT CAR GTT ART AA para Cytb (Monteiro et al., 2003); e GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G e TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA para COI (Folmer et al., 1994). Os fragmentos ITS1 e ITS2 foram amplificados com primers desenhados por Cláudia Solano Rocha (dados não publicados).

Para a amplificação dos fragmentos de DNA utilizou-se 1µl de cada *primer* (10,0 picomols), 1µl DNTP, 0,5µl de *Taq polimerase* de alta fidelidade (*Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity – Invitrogen*) com sua respectiva solução tampão e cloreto de magnésio, além de 3µl de DNAg e água deionizada para completar o volume de 50µl. O fragmento amplificado foi avaliado em gel de agarose 1%, utilizando peso molecular (*O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas*) com padrão de 75, 200, 300, 400, 500, 700, 1.000, 1.500, 2.000 pb. O produto da amplificação foi estocado em freezer (-20°C).

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (*GE Life Sciences*), de acordo com as instruções do fabricante e

para avaliar a concentração do DNA purificado, utilizou-se o equipamento *Thermo Scientific NanoDrop*® 2000, disponível no IFSC-USP.

III.3 – Sequenciamento do DNA amplificado

O produto purificado foi processado em sequenciador automático *MegaBACE 1000*® (*GE Healthcare Life Sciences*) no IFSC-USP. Algumas amostras seguiram para o Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, onde foram utilizados os sequenciadores da *Applied (Life Technologies)* ABI3100 e ABI3730XL, que utilizam o *BigDye* na versão 3.1. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada por meio da análise do eletroferograma com o auxílio do programa “*Electropherogram quality analysis*”, (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>).

III.4 – Alinhamento das sequências e análise filogenética

Para a avaliação das regiões homólogas, o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa “*ClustalW Multiple Alignment*” do “*BioEdit Sequence Alignment Editor*”® V. 7.0.9.0” (Hall, 1999). As sequências obtidas para cada um dos grupos (G1, G2 e G3) foram alinhadas com sequências da mesma espécie, que já se encontram depositadas no *GenBank*® (Tabela 2).

Tabela 2: Número de sequências disponíveis no *GenBank*[®] para cada espécie, durante as etapas iniciais do trabalho e os novos fragmentos propostos para análise (x).

Grupo	Espécie	Fragmento					
		COI	Cytb	16S	12S	ITS1	ITS2
G1	<i>R. prolixus</i>	1	3	7	-	-	2
	<i>R. robustus</i>	x	28	2	-	-	1
	<i>R. neglectus</i>	x	1	2	-	-	-
	<i>R. pictipes</i>	1	x	x	-	-	-
G2	<i>T. maculata</i>	2	x	4	1	x	x
	<i>T. pseudomaculata</i>	x	x	5	1	x	x
G3	<i>T. melanocephala</i>	x	x	x	-	-	-
	<i>T. tibiamaculata</i>	x	x	2	1	-	-
	<i>T. vitticeps</i>	x	x	3	1	-	-

Os filogramas filogenéticos foram construídos com o auxílio do algoritmo *Neighbor Joining* (NJ) do programa *MEGA 4.0*, com base nos alinhamentos anteriores. O grau de confiança dos ramos foi suportado por mil replicações (*Bootstrap*). O filograma facilita a visualização dos agrupamentos possíveis, referentes ao fragmento avaliado e indica como o desenho de *primers* específicos poderia separar as espécies.

Dentre as espécies estudadas, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* apresentavam grandes dúvidas em relação ao seu agrupamento junto às espécies do subcomplexo *T. brasiliensis*, bem como ao seu posicionamento filogenético. Dessa forma, as sequências geradas foram utilizadas (juntamente com sequências disponíveis em banco de dados) para um refinamento nas análises filogenéticas desse grupo. Para a reconstrução filogenética foi avaliada por meio da parcimônia máxima e da análise bayesiana dos fragmentos concatenados, na qual se pode unir os fragmentos e avaliá-los de acordo com o melhor modelo individual, e, dessa forma, refinar a análise, gerando maior confiabilidade no

suporte gerado para cada clado. Para essa análise foram utilizados os fragmentos 16S, Cytb e COI e um único haplótipo para cada gene com relação às espécies *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* e um para cada população de *T. melanocephala*.

III.5 – Desenho e teste dos *primers* específicos

Após o alinhamento das porções homólogas, as regiões mais semelhantes foram utilizadas para a construção de *primers* universais (que sevem para todas as espécies avaliadas), ou seja, que anelem nas regiões conservadas dos haplótipos e espécies a serem identificadas. Já as porções polimórficas foram utilizadas para construção de *primers* que anelem em regiões espécie-específicas de cada haplótipo, e assim, amplifiquem fragmentos de diferentes tamanhos para cada espécie.

Os *primers* foram desenhados e selecionados com base na temperatura de anelamento dos *primers* (entre 45°C e 60°C). Também foram considerados os melhores *scores*, para as espécies estudadas, a não formação de dímeros e os que não apresentam outros sítios de anelamento para os insetos da subfamília Triatominae com sequencias disponíveis. Os *primers* desenhados foram testados primeiramente pelo programa *Oligo Analyser 3.1* Disponível em <http://www.idtdna.com> (*Integrated DNA Technologies*). Assim, após essa avaliação virtual, os *primers* foram confeccionados e avaliados na prática, para obter a amplificação de fragmentos que apresentem tamanhos distintos entre as espécies de cada grupo.

III.6 – PCR-multiplex

Por fim foram testadas as diferentes combinações dos *primers* e de acordo com os resultados obtidos, em relação à eficiência e condições de reação, e, assim, foi avaliada a possibilidade de junção dos *primers*, para cada agrupamento de espécies avaliado, na tentativa de estabelecer uma reação de PCR (PCR-multiplex), que consiga separar cada uma das espécies. As condições de reação estão descritas junto aos respectivos resultados, de acordo com cada uma das combinações de *primers*.

IV. RESULTADOS

IV.1 – Análise inicial das sequências disponíveis em banco de dados.

Para o delineamento dos marcadores a serem utilizados a fim de desenhar os *primers* específicos, foram avaliadas as sequências dos fragmentos de genes mitocondriais e nucleares já depositadas no *GenBank*[®]. As sequências encontradas para cada um dos grupos foram alinhadas com a finalidade de observar se o fragmento apresenta quantidade de polimorfias e distribuição adequada para o desenho dos *primers* diagnósticos.

Para as espécies de *Rhodnius* (G1) foram encontradas 49 sequências para o fragmento Cytb (28 - *R. robustus*, uma - *R. neglectus* e 20 - *R. prolixus*); 11 para o 16S (duas - *R. robustus*, duas - *R. neglectus* e sete - *R. prolixus*); uma para o COI (*R. prolixus*); três para ITS2 (uma de *R. robustus* e duas de *R. prolixus*). Para o agrupamento G2 estão disponíveis nove sequências relativas ao fragmento 16S (quatro de *T. maculata* e cinco de *T. pseudomaculata*); duas para o 12S (uma de *T. maculata* e uma de *T. pseudomaculata*) e duas para o COI (*T. maculata*). Por fim, com relação às espécies agrupadas no G3, estão disponíveis cinco sequências para o fragmento 16S (duas de *T. tibiamaculata* e três de *T. vitticeps*); e duas para 12S (uma de *T. tibiamaculata* e uma de *T. vitticeps*) (Tabela 2). Optou-se em não evoluir os trabalhos com o fragmento 12S, pois este se mostrou extremamente conservado, com baixíssimo grau de polimorfias, o que impossibilita o desenho de *primers* diagnósticos.

IV.2 – Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir da musculatura das pernas de 54 exemplares adultos disponíveis no Insetário de Triatominae (Tabela 1). A integridade do

DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e observado sob a radiação ultravioleta (Figura 2).

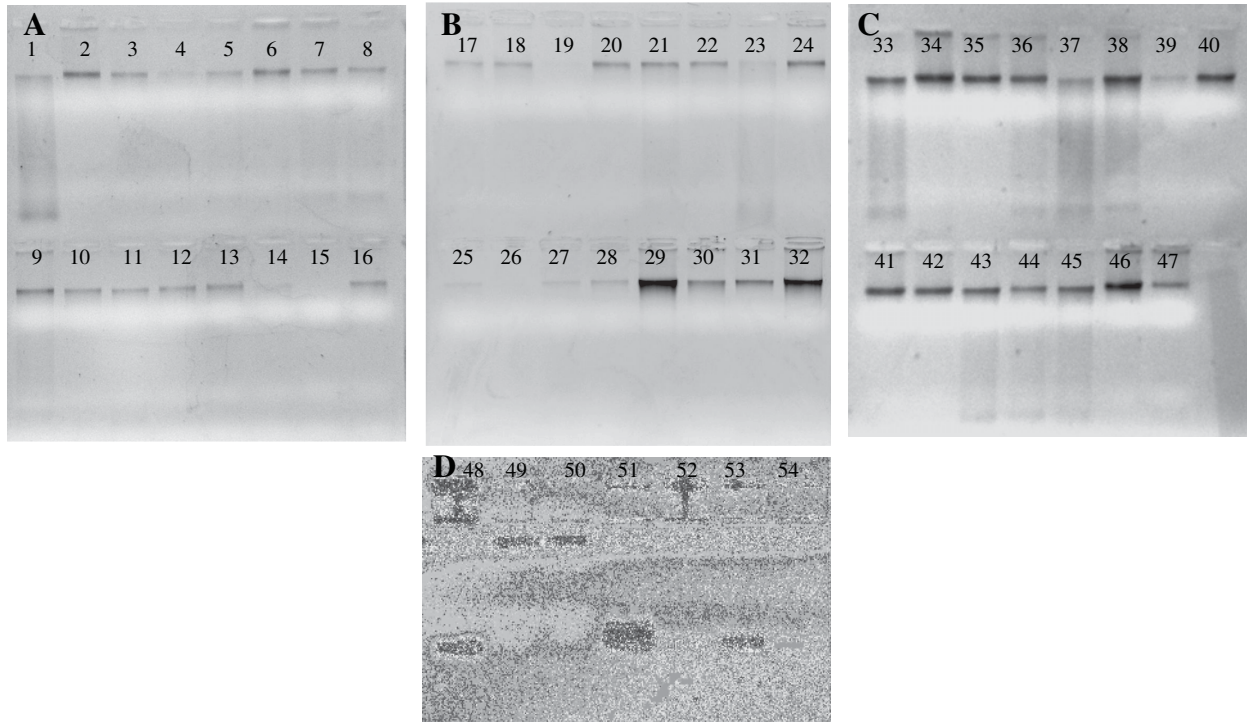


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose (1%) do DNA extraído de 54 exemplares do gênero *Rhodnius* e *Triatoma* avaliados. Amostras 1-16 (A), de 17-32 (B), 33-47 (C) e 48-54 (D): *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26, 44 e 45); *R. pictipes* (43 e 46); *R. robustus* (35-42); *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 15-17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54).

IV.3 - Amplificação (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse

Os fragmentos Cytb, 16S, COI, ITS1 e ITS2 foram amplificados e apresentaram cerca de 750, 450, 700, 1.100 e 900 pares de bases (pb) respectivamente. Os produtos amplificados estão em conformidade com os obtidos pelos autores que desenvolveram os *primers* (Monteiro et al., 2003; Lyman et al., 1999; Folmer et al., 1994) (Figuras 3-7).

Protocolo para amplificação do fragmento Cytb. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada
1 μ L de primer F
1 μ L de primer R
1 μ L de DNTP
4 μ L de $MgCl_2$
5 μ L do tampão da enzima
0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)
1 μ L de DNA genômico (extraído)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 3 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (45°C, por 90 segundos)
 - extensão (72°C, por 90 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 10 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

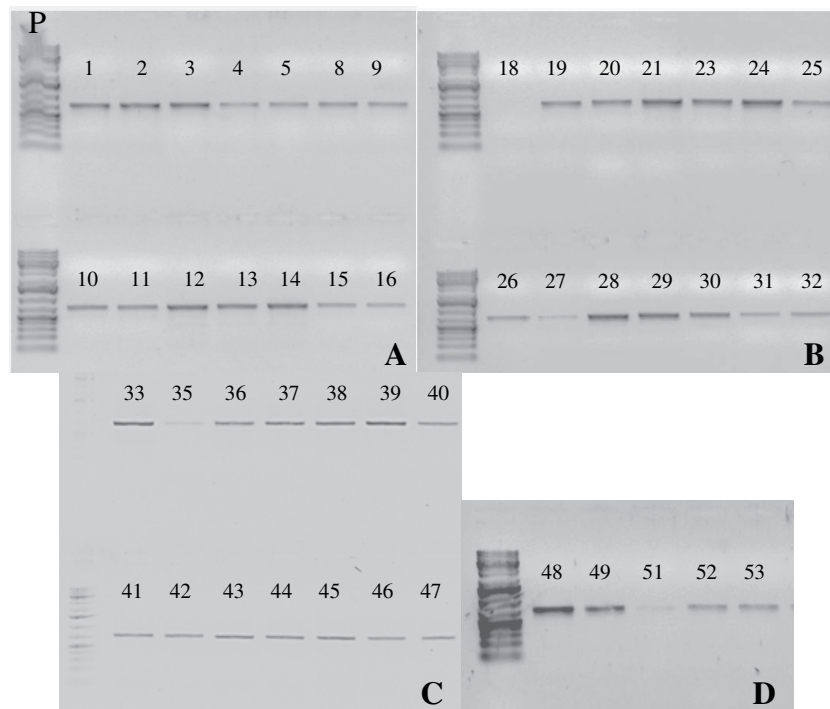


Figura 3: Produto da PCR relativo ao fragmento Cytb com cerca de 750 pb para as espécies *R. pictipes* (43 e 46); *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26, 44 e 45); *R. robustus* (35-42); *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-05, 08-09, 15-16, 21 e 23); *T. melanocephala* (29-33); *T. tibiamaculata* (47-49); *T. vitticeps* (51-53). Amostras 1-16 (A), 18-32 (B), 33-47 (C) e 48-53(D). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Protocolo para amplificação do fragmento 16S. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μL de água deionizada

1 μL de primer F

1 μL de primer R

1 μL de DNTP

4 μL de MgCl_2

5 μL do tampão da enzima

0,2 μL de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μL de DNA genômico (extraído)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C , por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C , por 60 segundos)
 - anelamento (50°C , por 60 segundos)
 - extensão (72°C , por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C .
- } 35 ciclos

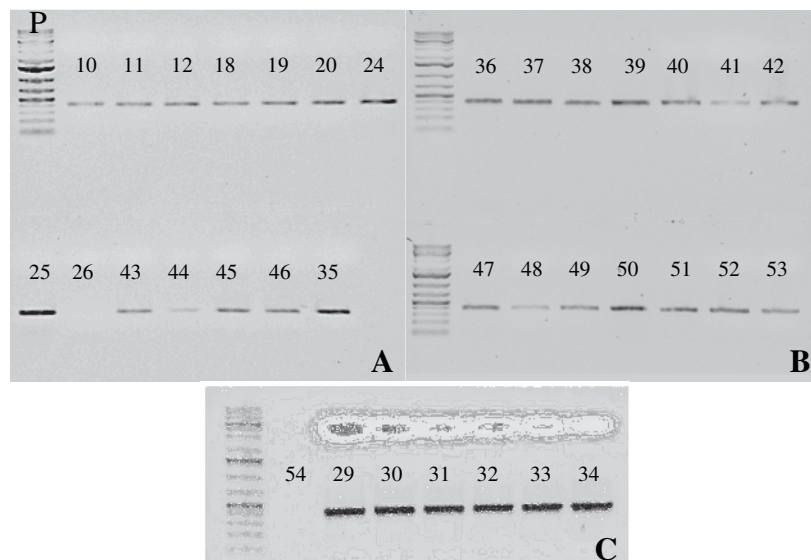


Figura 4: Produto da PCR relativo ao fragmento 16S com cerca de 450 pb para as espécies *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26 e 44); *R. pictipes* (43, 45 e 46); *R. robustus* (35-42); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54); *T. melanocephala* (29-34). Peso molecular O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas (P).

Protocolo para amplificação do fragmento COI. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada
1 μ L de primer F
1 μ L de primer R
1 μ L de DNTP
4 μ L de $MgCl_2$
5 μ L do tampão da enzima
0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)
1 μ L de DNA genômico (extraído)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 3 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (45°C, por 90 segundos)
 - extensão (72°C, por 90 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 10 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

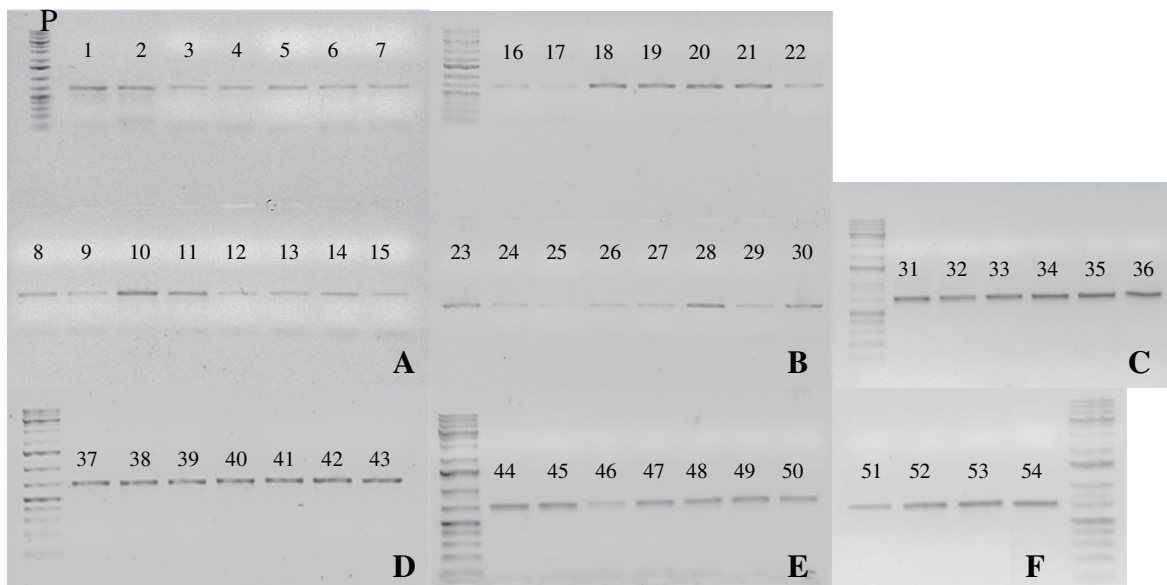


Figura 5: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento COI com cerca de 700 pb para as espécies *R. pictipes* (43 e 46); *R. neglectus* (10-12, 18-20, 24-26, 44 e 45); *R. robustus* (35-42); *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 15-17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Amostras 1-15 (A), de 16-30 (B), 31-36 (C) e 37-43 (D), 44-50 (E), 51-54 (F). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Protocolo para amplificação do fragmento ITS1. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,7 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F

1 μ L de primer R

1 μ L de DNTP

4 μ L de $MgCl_2$

5 μ L do tampão da enzima

0,3 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico (extraído)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (60°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

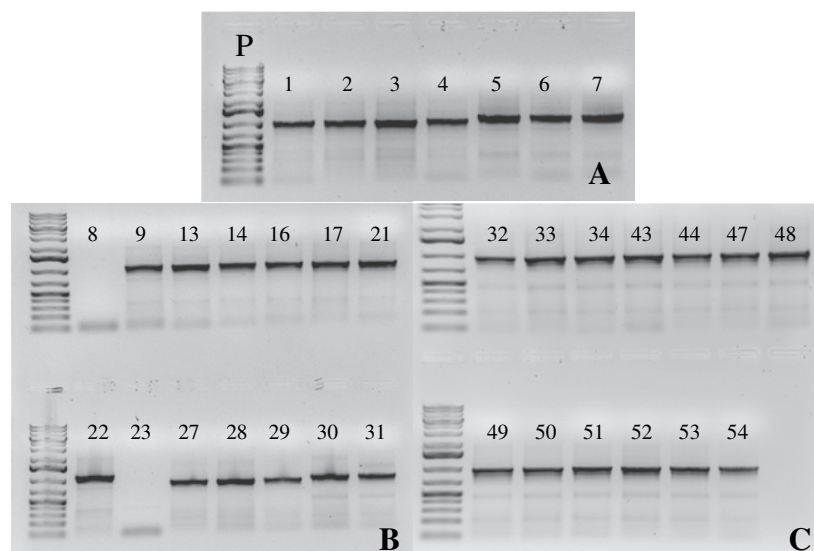


Figura 6: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento ITS1 com cerca de 1.100 pb para as espécies *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 16, 17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34, 43-44); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Amostras 1-7 (A), de 8-31 (B) e 32-54 (C). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Protocolo para amplificação do fragmento ITS2. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,7 μ L de água deionizada
1 μ L de primer F
1 μ L de primer R
1 μ L de DNTP
4 μ L de $MgCl_2$
5 μ L do tampão da enzima
0,3 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)
1 μ L de DNA genômico (extraído)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (53°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

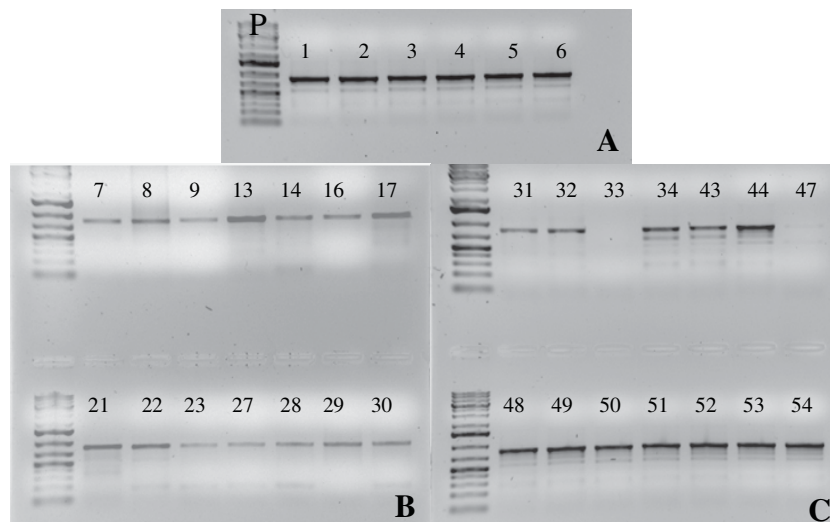


Figura 7: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento ITS2 com cerca de 900 pb para as espécies *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 16, 17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34, 43-44); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Amostras 1-6 (A), de 7-30 (B) e 31-54 (C). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Houve também a tentativa de amplificação de um fragmento intermediário (Itm) entre ITS1, e ITS2, com a finalidade de unir ambos os fragmentos e gerar outro maior, com início em ITS1, passando pelo 5,8S e terminando no ITS2. No entanto, esse fragmento não se mostrou adequado para o objetivo, não apresentou bom rendimento, assim, decidiu-se trabalhar com os fragmentos ITS1 e ITS2 separados e o Itm não foi sequenciado (Figura 8).

Protocolo para amplificação do fragmento Itm. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,7 μ L de água deionizada
1 μ L de primer F
1 μ L de primer R
1 μ L de DNTP
4 μ L de $MgCl_2$
5 μ L do tampão da enzima
0,3 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)
1 μ L de DNA genômico (extraído)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (48°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

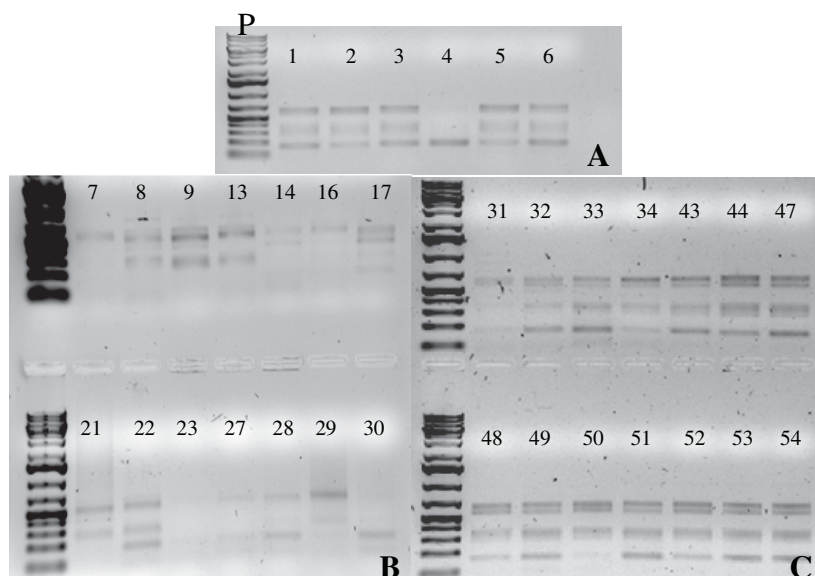


Figura 8: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento Itm para as espécies *T. maculata* (01-03, 13-14, 27-28); *T. pseudomaculata* (04-09, 16, 17, 21-23); *T. melanocephala* (29-34, 43-44); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Amostras 1-6 (A), de 7-30 (B) e 31-54 (C). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

IV.4 – Sequenciamento, alinhamento e análise dos dados

Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados. A qualidade das sequências foi avaliada pela análise do eletroferograma no programa *BioEdit* (Hall, 1999). Foram enviadas 147 amostras (duplicatas e sequências senso e anti-senso) para sequenciamento no IFSC-USP. Após a análise da qualidade das sequências por meio do eletroferograma no programa *BioEdit*, 132 sequências apresentaram ótima qualidade e foram utilizadas para compor os alinhamentos, as sequências com baixa qualidade foram repetidas.

As sequências senso e anti-senso (*forward* e *reverse*), de cada exemplar, foram alinhadas para se obter uma sequência consenso, o que corresponde ao resultado da comparação das duas sequências referentes a um mesmo organismo. Foi realizado um novo

alinhamento, com todas as sequências consensos dos exemplares de cada colônia analisada, onde foram comparadas as sequências obtidas para cada fragmento de gene avaliado, a fim de observar as regiões conservadas e polimórficas dos mesmos.

A escolha dos fragmentos utilizados para o desenho dos *primers* foi baseada no alinhamento das sequências retiradas do banco de dados (Tabela 2) juntamente às sequências obtidas neste trabalho. Desta forma, os fragmentos disponíveis para avaliação foram: Cytb, 16S, COI e ITS2, para G1; Cytb, 16S, COI, 12S, ITS1 e ITS2, para G2; Cytb, 16S, COI, 12S, ITS1 e ITS2, para G3 (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Fragmentos avaliados para cada um dos grupos.

Grupo	Fragmento					
	Cytb	16S	COI	12S	ITS1	ITS2
G1	Novas sequências e desenho e teste de novos primers	Novas sequências. NA	Novas sequências. NA	-	-	Poucas sequências disponíveis NA
G2	Novas sequências. Alinhamento sem regiões polimórficas NA	Novas sequências. Alinhamento sem regiões polimórficas NA	Novas sequências. Alinhamento sem regiões polimórficas NA	Poucas sequências disponíveis. Baixo grau de polimorfia. NA	Novas sequências. Alinhamento sem regiões polimórficas NA	Novas sequências. Alinhamento sem regiões polimórficas NA
G3	Novas sequências NA	Novas sequências e desenho e teste de novos primers	Novas sequências NA	Poucas sequências disponíveis. Baixo grau de polimorfia. NA	-	-

Nota: Sequências com padrão de polimorfias não adequado ao desenho de *primers* específicos (NA).

Tabela 4: Código das sequências retiradas do GenBank e número das colônias (CTA) dos exemplares utilizados para o sequenciamento.

Grupo	Espécie	Número de referência no <i>GenBank</i> [®]						
		COI	16S	12S	Cytb	ITS1	ITS2	
G1	<i>R. prolixus</i>	AF449138	AF324519	-	EU363822	-	-	
		-	CTA 080	-	EF011726	-	-	
		-	CTA 081	-	EF011716	-	-	
		-	CTA 082	-	CTA 076	-	-	
		-	-	-	CTA 079	-	-	
	<i>R. robustus</i>	-	EU827206	-	EF071583	EF011720	-	-
		-	AF045705	-	AF421340	AF421341	-	-
		-	CTA 083	-	EF011709	FJ887793	-	-
		-	CTA 084	-	EF011710	EU363824	-	-
		-	CTA 085	-	EF011711	AF047717	-	-
		-	CTA 086	-	EF011713	EF011719	-	-
		-	-	-	EF011714	EF011715	-	-
		-	-	-	EF011724	EF011718	-	-
		-	-	-	EF011728	EF011725	-	-
		-	-	-	EF011712	EF011722	-	-
		-	-	-	EF011727	EF011717	-	-
		-	-	-	AF421343	AF421342	-	-
		-	-	-	CTA 083	-	-	-
		-	-	-	CTA 084	-	-	-
		-	-	-	CTA 085	-	-	-
-	-	-	CTA 086	-	-	-		
<i>R. neglectus</i>	CTA 057	AF045704	-	CTA 055	-	-		
	CTA 055	EU822951	-	CTA 057	-	-		
	CTA 063	CTA 055	-	CTA 063	-	-		
<i>R. pictipes</i>	AF449136	CTA 071	-	-	-	-		
G2	<i>T. maculata</i>	CTA 140	AF324524	AF324512	CTA 140	CTA 140	CTA 140	
		CTA 141	EU827230	-	CTA 141	CTA 141	CTA 141	
	-	EU827231	-	-	-	-	-	
	<i>T. pseudomaculata</i>	CTA152	AY035461	AY185827	CTA152	CTA152	CTA152	
		CTA 154	AY185841	-	CTA 154	CTA 154	CTA 154	
		CTA 158	EU827225	-	CTA 155	CTA 158	CTA 158	
		-	EU827207	-	-	-	-	
-		EU827226	-	-	-	-		
G3	<i>T. melanocephala</i>	CTA 219	CTA 219	-	CTA 219	-	-	
		CTA 220	CTA 220	-	CTA 220	-	-	
		CTA 221	CTA 221	-	CTA 221	-	-	
	<i>T. tibiamaculata</i>	CTA 195	AY185843	AY185829	CTA 195	-	-	
		CTA 196	AY035453	-	CTA 196	-	-	
	<i>T. vitticeps</i>	CTA 198	EU827202	AF021217	CTA 198	-	-	
		CTA 199	EU827203	-	CTA 199	-	-	
-	-	AF021218	-	-	-	-		

Nota: Os códigos representam os números de acesso das sequências no *GenBank*[®].
CTA– Colônia de Triatominae de Araraquara.

IV.4.1 – G1

IV.4.1.1 Alinhamento das sequências

Para as espécies de *Rhodnius* (G1) estavam disponíveis no *GenBank*[®], duas sequências para o fragmento COI (*R. prolixus* e *R. pictipes*) e foram sequenciados mais três exemplares de *R. neglectus* (Figura 9). No entanto, o fragmento COI não apresentou um padrão de polimorfias consistente para o desenho de *primers* específicos. Da mesma forma, os fragmentos 28S e ITS2 não apresentaram sequências suficientes para a avaliação do desenho de *primers* diagnósticos.

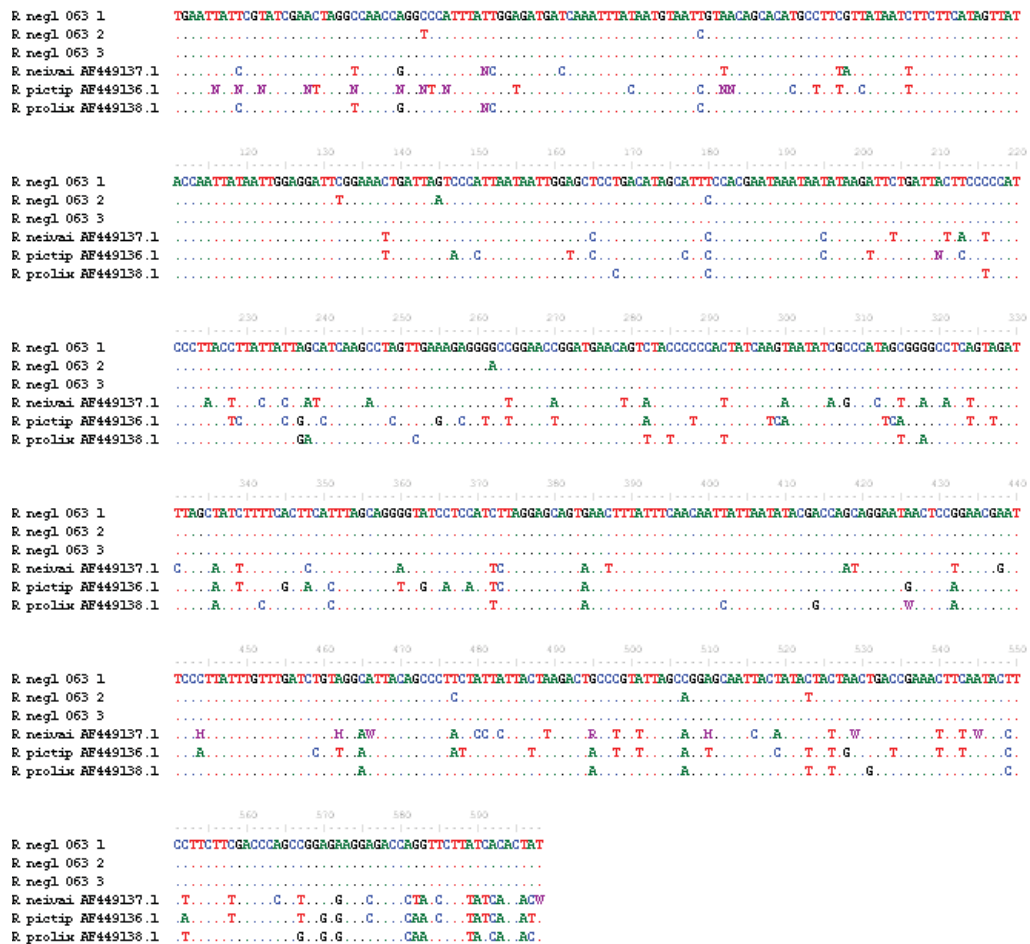


Figura 9: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento COI (598 pb) para o G1 e de sequências disponíveis no *GenBank*[®]. Na legenda da figura lê-se a abreviatura da espécie, a colônia ou o número de acesso. *R. neglectus* (R negl), *R. pictipes* (R. pictip), *R. prolixus* (R prolix).

Foram avaliadas 36 sequências para o fragmento Cytb (28 para *R. robustus*, três para *R. neglectus*, cinco para *R. prolixus*) e 20 para o 16S (sete para *R. robustus*, quatro para *R. neglectus*, cinco para *R. prolixus* e quatro para *R. pictipes*). O alinhamento das sequências de 16S apresentou regiões polimórficas dispersas e o Cytb, além das regiões polimórficas, a distribuição das polimorfias propiciou o desenho de *primers* específicos para *Rhodnius* (Figuras 10 e 11).

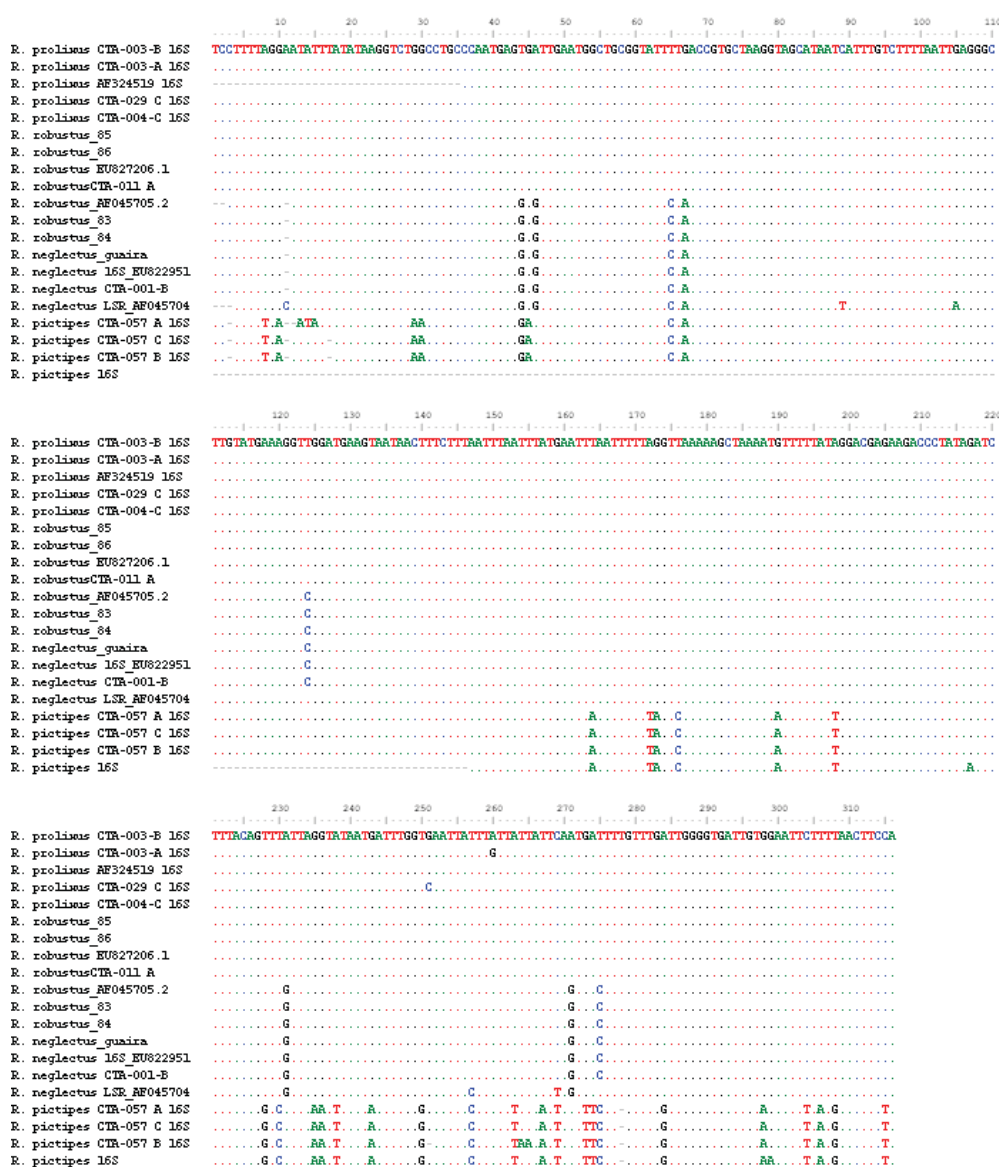


Figura 10: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento 16S (316 pb) para o G1 e de sequências disponíveis no *GenBank*®. Na legenda da figura lê-se nome da espécie e a referência da colônia ou o número de acesso da sequência.

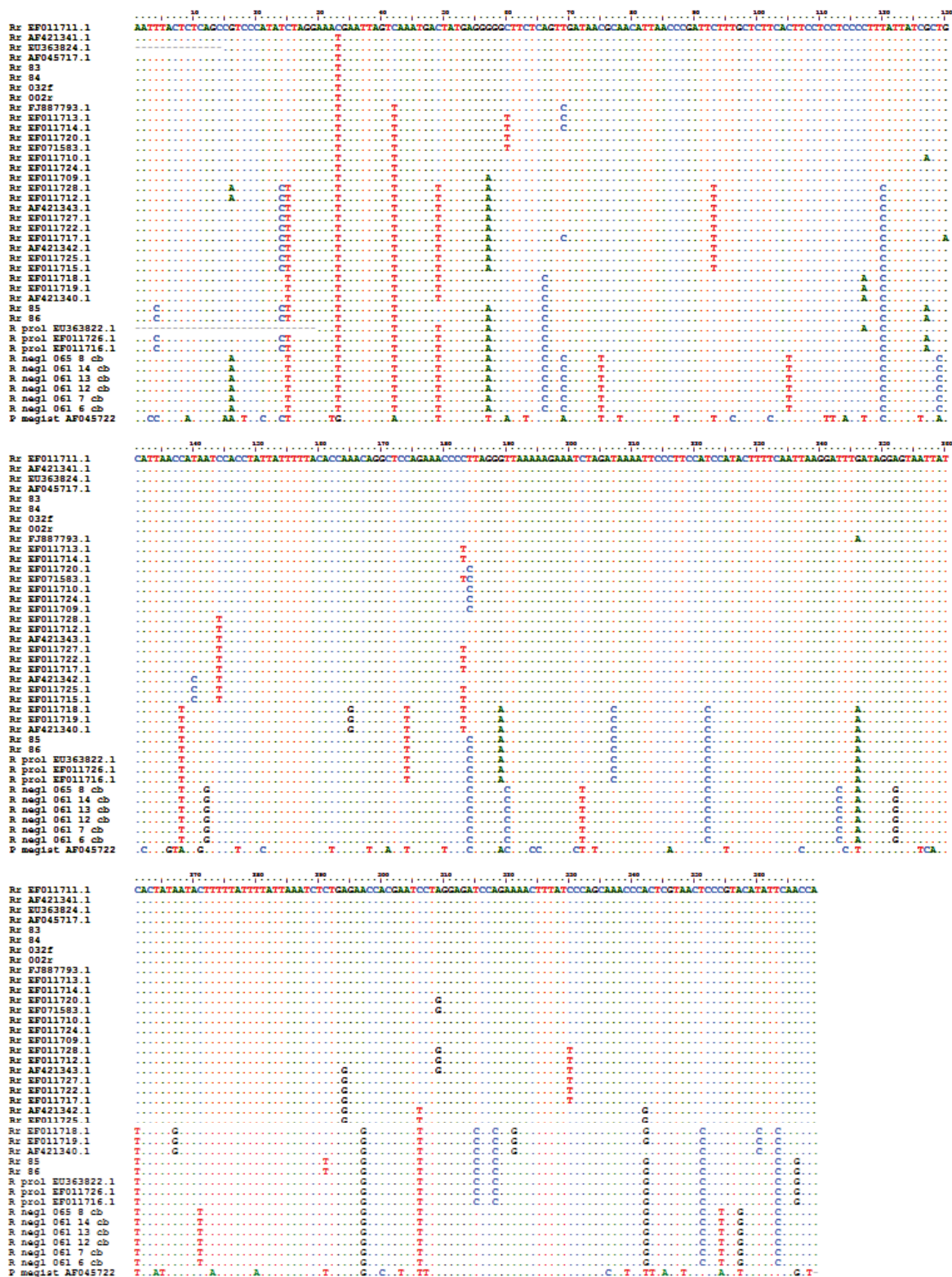


Figura 11: Alinhamento das sequências do fragmento Cytb (369 pb) para o G1 e de sequências disponíveis no *GenBank*®. Na legenda da figura lê-se nome da espécie e a referência da colônia ou o número de acesso da sequência. *R. neglectus* (R negl), *R. prolixus* (R prol) e *R. robustus* (Rr).

IV.4.1.2 – G1 - Análise filogenética

O filograma pode facilitar a visualização dos agrupamentos possíveis, referentes ao fragmento avaliado e indicar como o desenho de *primers* específicos poderia separar as espécies (Figuras 12 e 13).

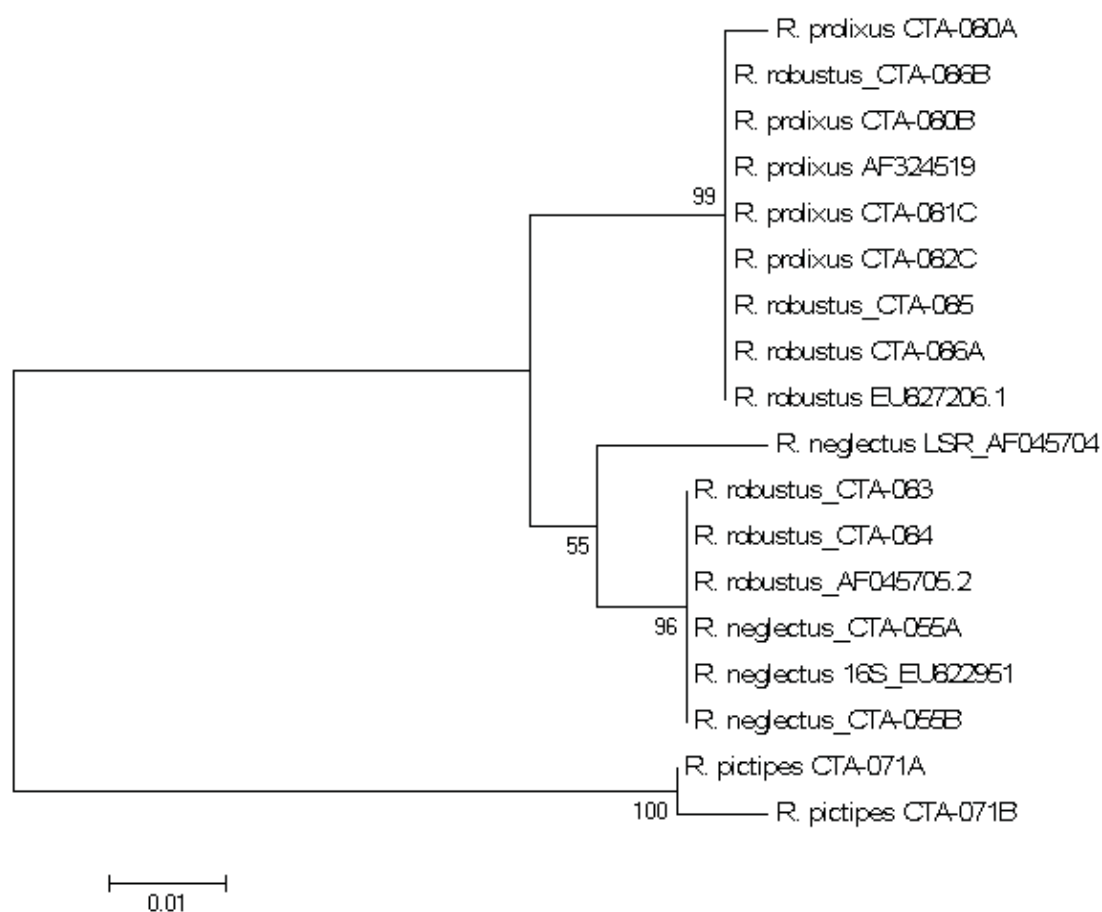


Figura 12: Filograma (NJ) gerado pelo programa *MEGA 5.05* e baseado no alinhamento do fragmento 16S do G1. Na legenda da figura lê-se nome da espécie e a referência da colônia ou o número de acesso da sequência.

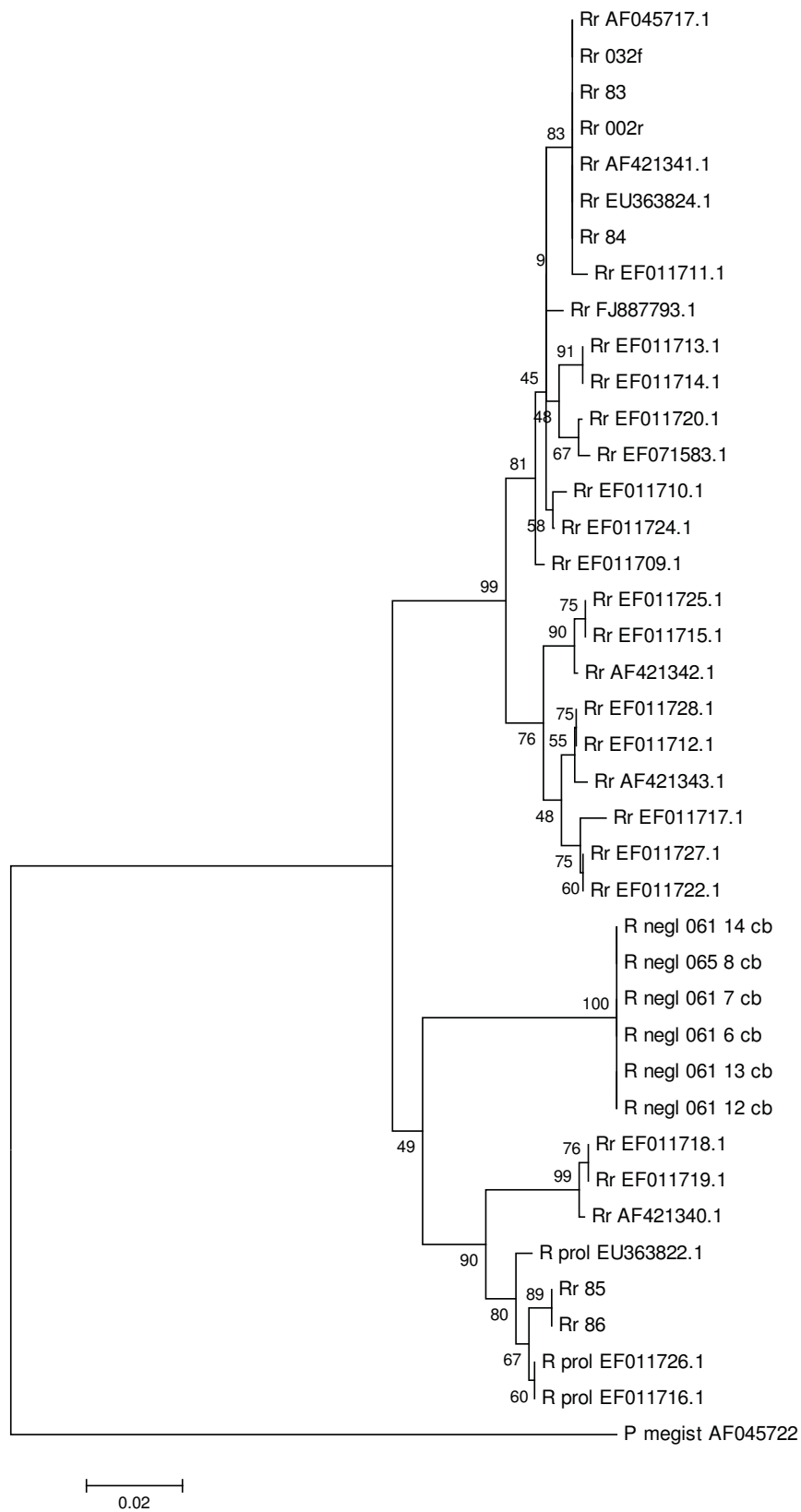


Figura 13: Filograma (NJ) gerado pelo programa *MEGA 5.05* e baseado no alinhamento do fragmento Cytb do G1. Na legenda da figura lê-se nome da espécie e a referência da colônia ou o número de acesso da sequência. *Rhodnius neglectus* (R negl), *R. prolixus* (R prol) e *R. robustus* (Rr).

IV.4.1.3 – G1 - PCR-multiplex teste dos *primers*

Para as espécies de *Rhodnius* do G1, primeiramente foram avaliados os *primers* “universal” (Forward), “*R. robustus* I” (Reverse), “*R. robustus* II-IV” (Reverse) e “*R. prolixus*” (Reverse), para diferenciar *R. prolixus* e *R. robustus* (Pavan e Monteiro, 2007). Essa metodologia foi posteriormente testada para *R. neglectus* e *R. pictipes* neste trabalho. Os resultados mostraram que além da diferenciação entre *R. prolixus* e *R. robustus* proposta anteriormente, também foi possível definir padrões de diferenciação para *R. neglectus* e *R. pictipes*. Contudo, podemos notar quatro fragmentos de aproximadamente 380pb, 280pb (mais evidente), 250pb e 150pb para *R. prolixus*; dois fragmentos de aproximadamente 280pb e 250pb (mais evidente) para *R. neglectus*; um fragmento de cerca de 280pb para *R. robustus* (grupo 2, segundo Monteiro et al., 2003); e um fragmento de 250 pb para *R. pictipes* (Figura 14 e Tabela 5).

Protocolo para PCR-multiplex relativo ao fragmento *Cytb* das espécies de *Rhodnius*. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

- 33 µL de água deionizada
- 1 µL de primer F (120 ng)
- 1 µL de cada primer R (120 ng)
- 2 µL de DNTP (0,25 mM)
- 4 µL de MgCl₂ (15 mM)
- 5 µL do tampão da enzima (10X)
- 2 µL de enzima Taq polimerase (Biotools)
- 2 µL de DNA genômico (20-40 ng)

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (45°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
- } 35 ciclos
- extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.

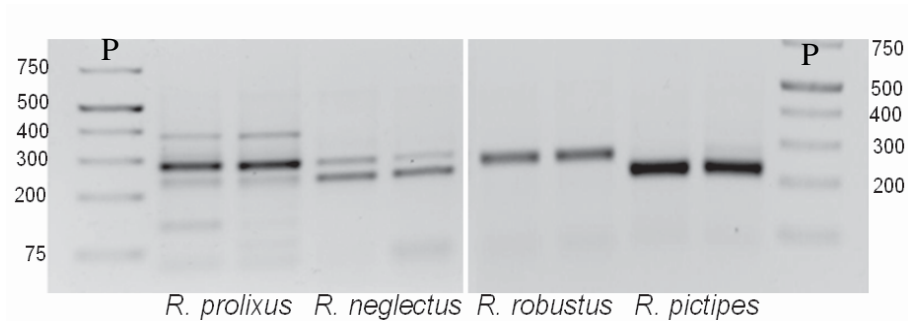


Figura 14: Produto da PCR-multiplex relativo ao fragmento Cytb, com quatro padrões distintos de bandas, sendo um para cada uma das seguintes espécies: *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. pictipes*. Peso molecular O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas (P).

Tabela 5: Resultado da avaliação da PCR-multiplex relativos às espécies do grupo G1. Os primers diagnósticos relativos ao fragmento Cytb apresentaram padrões de amplificação distintos para cada espécie.

Tamanho do fragmento gerado (pb)	<i>R. prolixus</i>	<i>R. neglectus</i>	<i>R. robustus</i>	<i>R. pictipes</i>
150	x			
250	x	x		x
280	x	x	x	
380	x			

Nota: fragmento amplificado (x)

IV.4.2 – G2

IV. 4.2.1 – Sequenciamento do DNA amplificado e alinhamento das sequências

Para o agrupamento G2 estão disponíveis no *GenBank*[®] oito sequências para o fragmento 16S (três para *T. maculata* e cinco para *T. pseudomaculata*); duas para 12S (uma para *T. maculata* e uma para *T. pseudomaculata*). Também foram sequenciados os fragmentos mitocondriais COI e Cytb. Os alinhamentos relativos aos fragmentos 16S, 12S, COI, Cytb não apresentaram regiões polimórficas, o que impossibilita o desenho de *primers* específicos com base nesses fragmentos (Figuras 15-18). Os fragmentos nucleares ITS1 e ITS2 para as espécies *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, da mesma forma que os marcadores mitocondriais avaliados, não apresentaram regiões variáveis que possibilitassem o desenho de *primers* específicos. Assim, até o momento não foi possível estabelecer um fragmento adequado ao desenho de *primers* diagnósticos, que permita a identificação de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

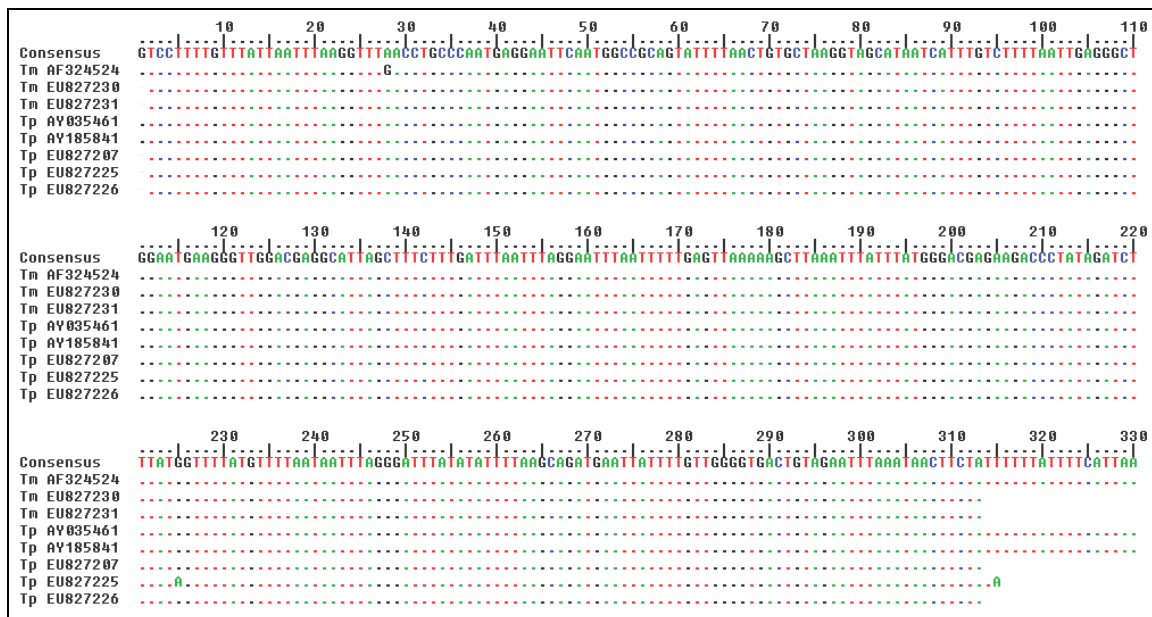


Figura 15: Alinhamento das sequências das espécies do G2, relativas ao fragmento 16S, que se encontram disponíveis em banco de dados. *Triatoma maculata* (Tm) e *T. pseudomaculata* (Tp) com o número de acesso no *GenBank*[®].

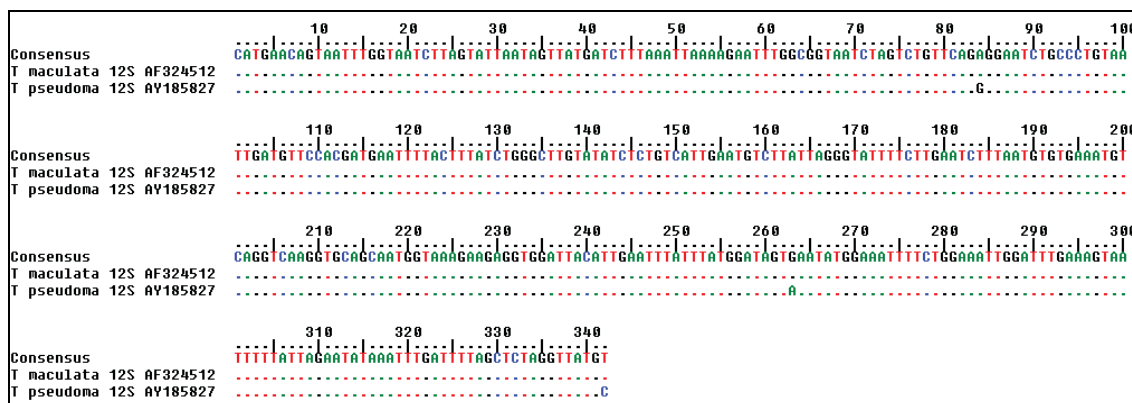


Figura 16: Alinhamento das sequências das espécies do G2, relativas ao fragmento 12S, que se encontram disponíveis em banco de dados. Na legenda consta a abreviatura da espécie e o respectivo número de acesso no *GenBank*[®]. *T. maculata* (T maculata) e *T. pseudomaculata* (T. pseudoma).

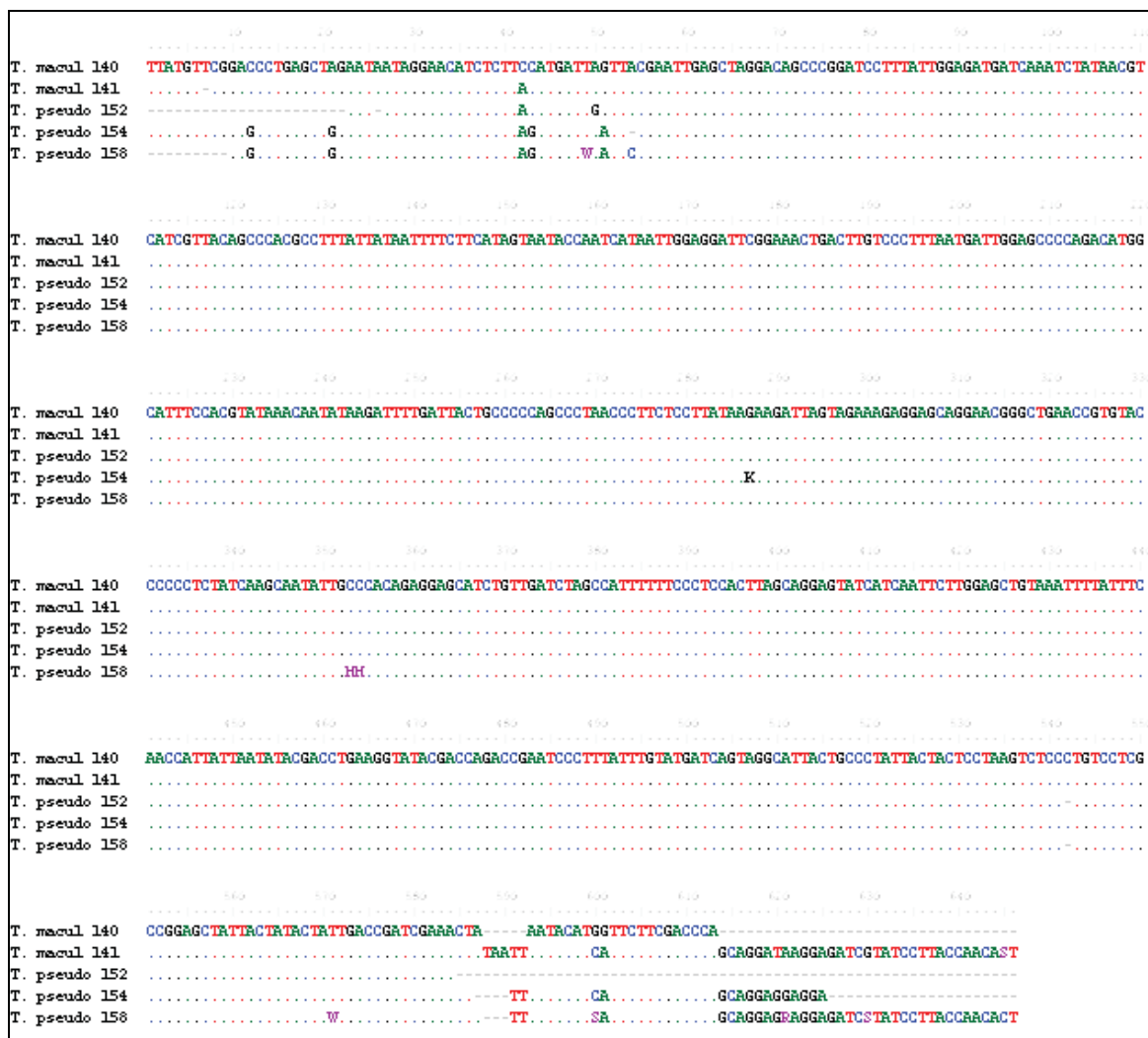


Figura 17: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento COI (646 pb) para o G2. Na legenda da figura lê-se a abreviatura da espécie e o número da colônia. *T. maculata* (T. macul) e *T. pseudomaculata* (T. pseudo).

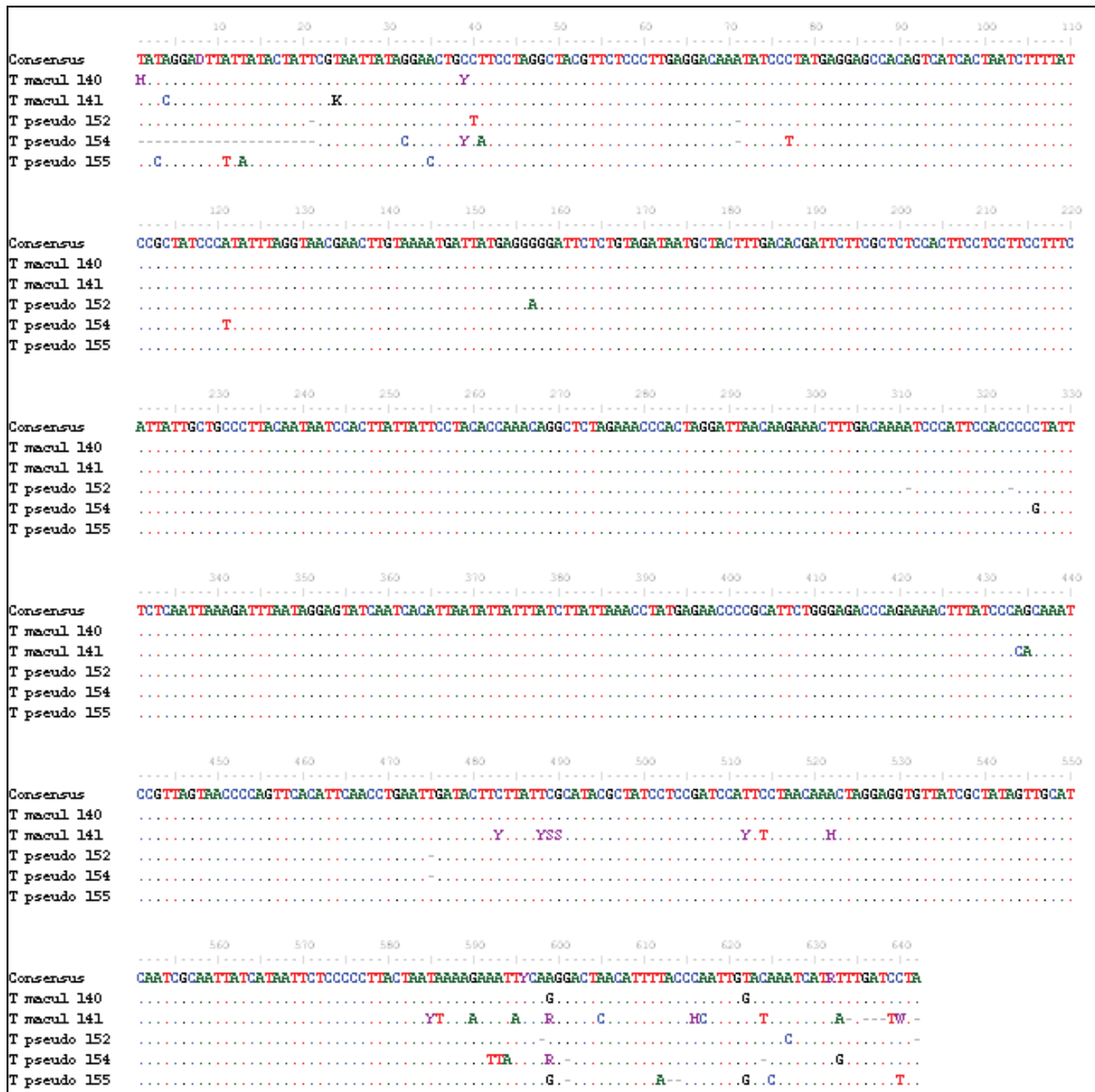


Figura 18: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento Cytb (642 pb) para o G2. Na legenda da figura lê-se a abreviatura da espécie e o número da colônia. *T. maculata* (T macul) e *T. pseudomaculata* (T pseudo).

IV.4.3 – G3

IV. 4.3.1 – Sequenciamento do DNA amplificado e alinhamento das sequências

As espécies agrupadas no G3 apresentam disponíveis cinco sequências para o fragmento 16S (duas para *T. tibiamaculata* e três para *T. vitticeps*); e duas para 12S (uma para *T. tibiamaculata* e uma para *T. vitticeps*). Não foram encontradas sequências no *GenBank*[®] para *T. melanocephala*. O fragmento 12S não apresentou polimorfias suficientes para seguir com o desenho dos *primers* específicos (Figuras 19-21).

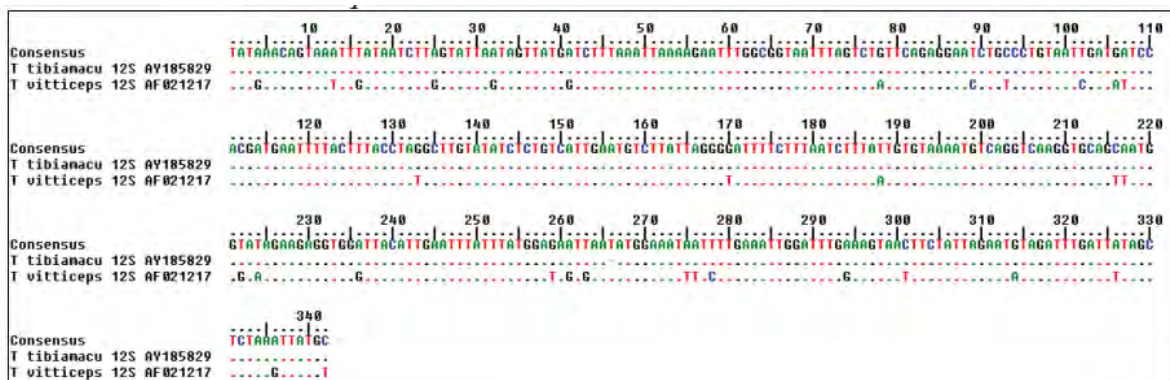


Figura 19: Alinhamento das sequências das espécies do G3, relativas ao fragmento 12S, que se encontram disponíveis em banco de dados. Na legenda consta o nome da espécie e o respectivo número de acesso no *GenBank*[®]. *T. tibiamaculata* (T tibiamacu) e *T. vitticeps* (T vitticeps).

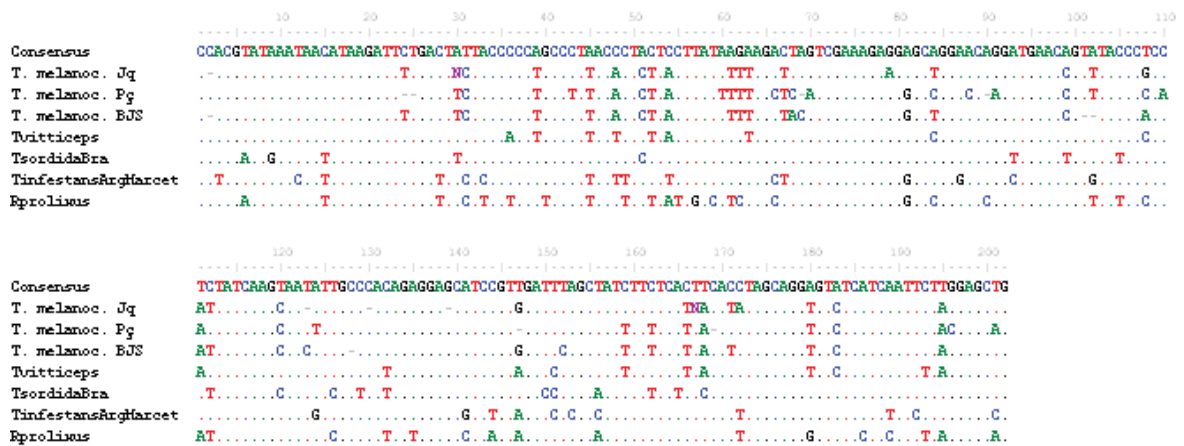


Figura 20: Alinhamento das sequências das espécies do G3, relativas ao fragmento COI, que se encontram disponíveis em banco de dados. Na legenda consta o nome da espécie e o respectivo número de acesso no *GenBank*[®]. *T. tibiamaculata* (T tibiamacu) e *T. vitticeps* (T vitticeps).



Figura 21: Alinhamento das sequências obtidas pela amplificação do fragmento 16S (440 pb) para o G3 e de sequências disponíveis no *GenBank*[®]. Na legenda da figura lê-se a abreviatura da espécie, a colônia do exemplar ou o número de acesso da sequência. *T. tibiamaculata* (T tib), *T. vitticeps* (T vit) e *T. melanocephala* (T mel).

IV. 4.3.2 – G3 - Análise filogenética para o desenho de primers

Os fragmentos 16S e COI apresentaram regiões polimórficas variadas, sendo que o 16S mostrou-se mais promissor com relação ao desenho de *primers* diagnósticos, por apresentar uma boa distribuição das polimorfias e um ótimo posicionamento das espécies no filograma filogenético estruturado (Figura 22).

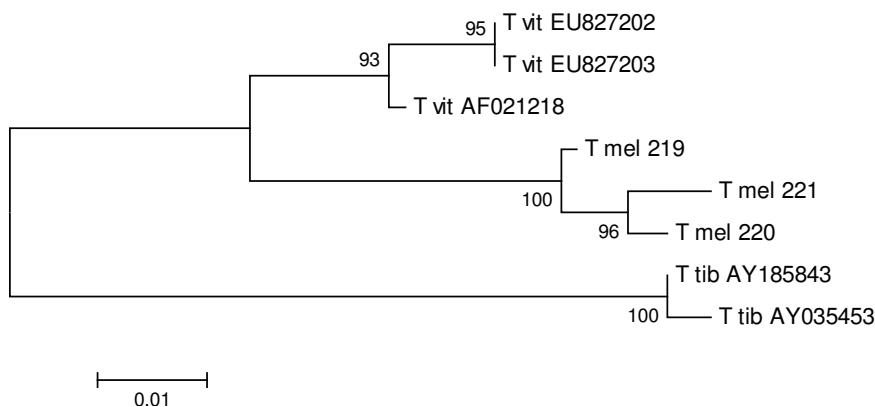


Figura 22: Filograma filogenético (NJ) gerado pelo programa *MEGA 5.05* e baseado no alinhamento do fragmento 16S do G3. Na legenda da figura lê-se a abreviatura da espécie, a colônia do exemplar ou o número de acesso da sequência. *T. tibiamaculata* (T tib), *T. vitticeps* (T vit) e *T. melanocephala* (T mel).

IV. 4.3.3 – G3 - Desenho e teste dos *primers* específicos

O fragmento 16S foi a base para o desenho dos *primers* relativos ao G3 (Figuras 21 e 22). A análise virtual dos *primers* apresentados foi realizada por meio do programa *OligoAnalyzer 3.1*, disponível no site <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications> (Tabela 6).

Assim, são propostos sete novos *primers*, a fim de obter padrões distintos de amplificação para cada uma das espécies *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* e *T. melanocephala*.

Primer forward (F)

F1 Universal (G3F1u) GAG GAA TTG AAT GGC CGC AG

Primers reverse (R) (complemento reverso)

R1 para *T. tibiamaculata* (G3R1Tt) CTT CAA TTT AAA ACA AAG AAA GC
 R2 para *T. tibiamaculata* (G3R2Tt) CCC TAA ATT ATT GAA ACT TCA AA
 R3 para *T. vitticeps* (G3R3Tv) C CAA AAT AAT CCA TTT ACT TCA
 R4 para *T. melanocephala* (G3R4Tm) CCTC AAT TAA ATT AAA GAA AGT TT
 R5 para *T. melanocephala* (G3R5Tm) CCAC CAC ATT ATC AAA ATA TAA AA
 R6 Universal (G3R6u) CCTA CAG TCA CCC CAA CAA AAT AA

Tabela 6: Resultado da análise dos *primers* desenhados para o fragmento 16S relativo ao G3. Pares de bases (pb); Temperatura de *melting* (TM).

<i>Primers</i>	Nome do <i>primer</i>	Início-fim (pb)	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	TM (°C)	Porcentagem de CG	Tamanho do fragmento (pb) F1 x R
<i>Forward</i>	F1 Universal	38-57	20	56,7	55	-
<i>Reverse</i>	R1 Tt	136-158	23	47,5	26	120
	R2 Tt	227-249	23	47,4	26	211
	R3 Tv	260-281	22	45,4	27	243
	R4 Tm	133-156	24	45,3	21	118
	R5 Tm	226-249	24	46,5	25	211
	R6 Universal	273-296	24	53,8	42	258

Após a confecção dos *primers*, F1 foi avaliado com todas as combinações possíveis junto aos *primers* reversos (R1-R6). Primeiramente os *primers* F1 e R6, para obter o fragmento mais extenso possível, dentre os *primers* desenhados (Figura 23). E as etapas seguintes, foram feitas a partir dessa primeira reação de amplificação, a isso damos o nome de “*Nested polymerase chain reaction*” (*Nested PCR*) (Figuras 24-28).

Protocolo para teste dos primers F1 e R6. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F (120 ng)

1 μ L de primer R (120 ng)

1 μ L de DNTP (0,25 mM)

4 μ L de $MgCl_2$ (15 mM)

5 μ L do tampão da enzima (10X)

0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (52°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
- } 35 ciclos
- extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.

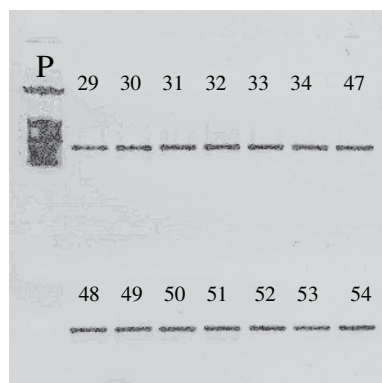


Figura 23: Produto da PCR de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R6, com 258 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Protocolo para teste dos primers F1 e R1. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F (120 ng)

1 μ L de primer R (120 ng)

1 μ L de DNTP (0,25 mM)

4 μ L de $MgCl_2$ (15 mM)

5 μ L do tampão da enzima (10X)

0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (45°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

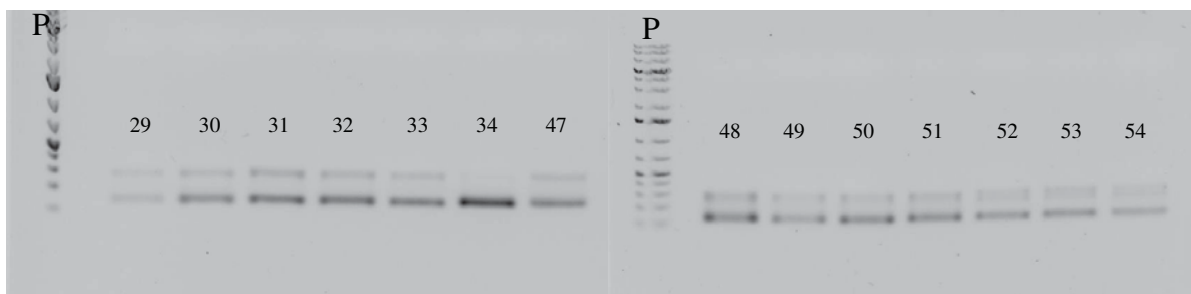


Figura 24: Produto da *Nested PCR* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os primers F1 e R1, com um fragmento de 120pb (esperado) e outro em torno de 300 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Protocolo para teste dos primers F1 e R2. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F (120 ng)

1 μ L de primer R (120 ng)

1 μ L de DNTP (0,25 mM)

4 μ L de $MgCl_2$ (15 mM)

5 μ L do tampão da enzima (10X)

0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (46°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

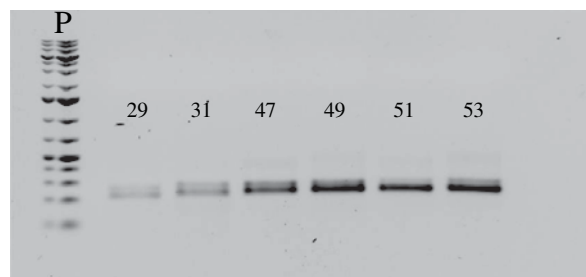


Figura 25: Produto da Nested PCR de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os primers F1 e R2, com um fragmento de 211pb e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29 e 31); *T. tibiamaculata* (47 e 49); *T. vitticeps* (51 e 53). Peso molecular O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas (P).

Protocolo para teste dos primers F1 e R3. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F (120 ng)

1 μ L de primer R (120 ng)

1 μ L de DNTP (0,25 mM)

4 μ L de $MgCl_2$ (15 mM)

5 μ L do tampão da enzima (10X)

0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (44°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

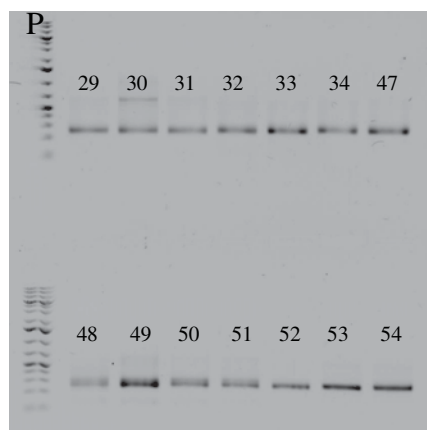


Figura 26: Produto da Nested PCR de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os primers F1 e R3, com um fragmento de 243pb (esperado) e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Peso molecular O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas (P).

Protocolo para teste dos primers F1 e R4. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F (120 ng)

1 μ L de primer R (120 ng)

1 μ L de DNTP (0,25 mM)

4 μ L de $MgCl_2$ (15 mM)

5 μ L do tampão da enzima (10X)

0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (45°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

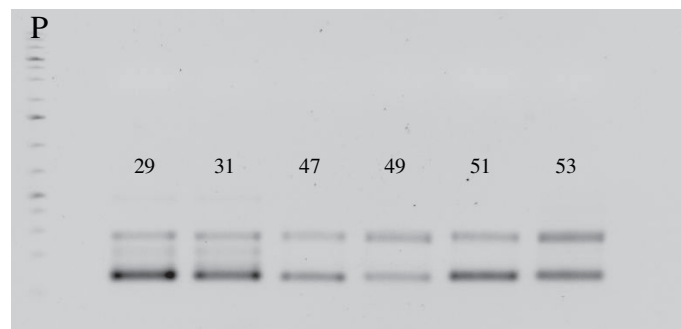


Figura 27: Produto da Nested PCR de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os primers F1 e R4, com um fragmento de 211pb (esperado) e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Protocolo para teste dos primers F1 e R5. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 μ L de água deionizada

1 μ L de primer F (120 ng)

1 μ L de primer R (120 ng)

1 μ L de DNTP (0,25 mM)

4 μ L de $MgCl_2$ (15 mM)

5 μ L do tampão da enzima (10X)

0,2 μ L de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 μ L de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (45°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

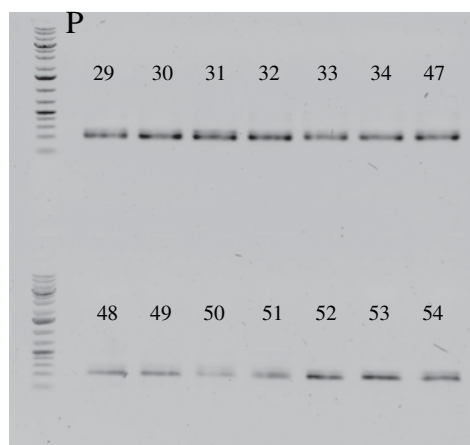


Figura 28: Produto da Nested PCR de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os primers F1 e R5, com um fragmento de 211pb (esperado) e outro em torno de 280 pb para as espécies *T. melanocephala* (29-34); *T. tibiamaculata* (47-50); *T. vitticeps* (51-54). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

IV. 4.3.4– G3 - PCR-multiplex

Por último, foi testada a junção dos *primers* (PCR-multiplex) que apresentaram melhores resultados (F1 + R2 + R3 + R4), essa reação foi realizada também a partir da *Nested PCR* e assim chamamos de *Nested Multiplex PCR*. Com base no padrão de amplificação da *Nested Mltiplex PCR* notam-se três fragmentos para espécies *T. melanocephala* com aproximadamente 100pb, 180pb e 250; dois para *T. tibiamaculata*, com cerca de 200pb e 250pb; e um para *T. vitticeps*, em torno de 250pb (Figura 29).

Protocolo para PCR-multiplex relativo ao fragmento 16S para as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

36,8 µL de água deionizada

1 µL de primer F (120 ng)

1 µL de cada primer R (120 ng)

1 µL de DNTP (0,25 mM)

4 µL de MgCl₂ (15 mM)

5 µL do tampão da enzima (10X)

0,2 µL de enzima Taq polimerase High Fidelity (Fermentas)

1 µL de DNA genômico

A reação seguiu as seguintes etapas:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 60 segundos)
 - anelamento (47°C, por 60 segundos)
 - extensão (72°C, por 60 segundos),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 35 ciclos

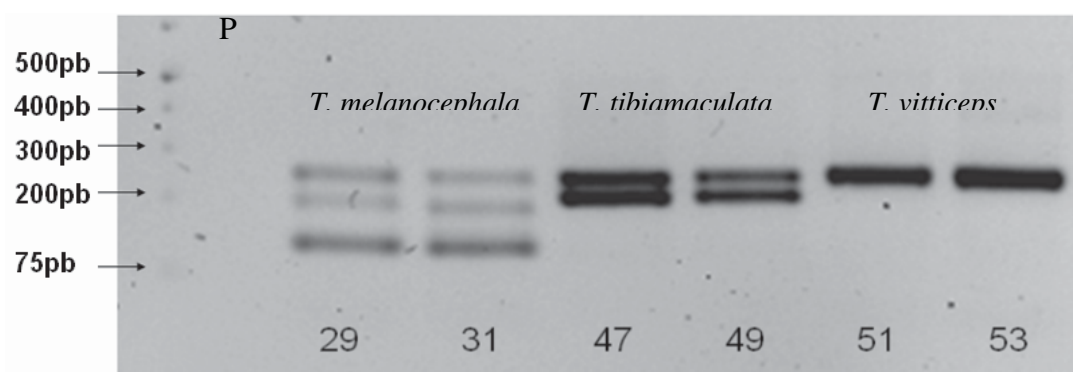


Figura 29: Produto da *Nested PCR-multiplex* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R2, R3 e R4, para as espécies *T. melanocephala* (29 e 31); *T. tibiamaculata* (47 e 49); *T. vitticeps* (51 e 53). Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

A mesma reação de *Nested Multiplex PCR*, utilizando os *primers* F1, R2, R3 e R4, foi utilizada para espécies relacionadas ao subcomplexo *T. brasiliensis*, para verificar sua sensibilidade e especificidade. Foram utilizados os fragmentos amplificados 16S para as espécies *T. brasiliensis*, *T. lenti* e *T. sherlocki*. Além dos fragmentos observados na figura 29, *T. brasiliensis* mostrou cinco fragmentos entre 100 e 400pb; *T. lenti* outros cinco fragmentos entre 180 e 400pb; e *T. sherlocki* apresentou três fragmentos em torno de 180, 200 e 400pb (Figura 30 e Tabela 7).

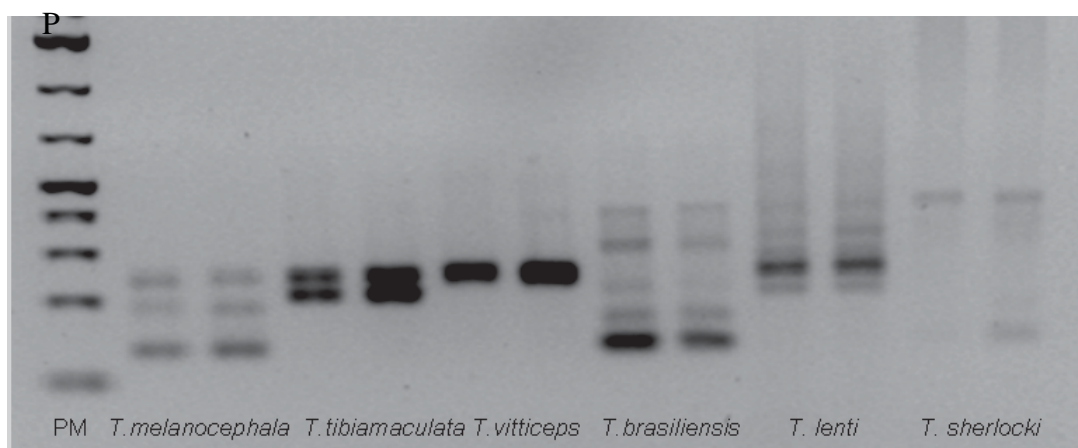


Figura 30: Produto da *Nested PCR-multiplex* de amplificação relativa ao fragmento 16S, utilizando os *primers* F1 e R2, R3 e R4, para as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps*, *T. brasiliensis*, *T. lenti* e *T. sherlocki*. Peso molecular *O'GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder-Fermentas* (P).

Tabela 7: Resultado da avaliação da *Nested Multiplex PCR* com os *primers* diagnósticos desenhados (F1 + R2 + R3 + R4) referentes às espécies do grupo G3 e outras espécies consideradas no subcomplexo *T. brasiliensis*. Os *primers* diagnósticos relativos ao fragmento 16S apresentaram padrões de amplificação distintos para cada espécie.

Tamanho aproximado do fragmento gerado	<i>T. melanocephala</i>	<i>T. tibiamaculata</i>	<i>T. vitticeps</i>	<i>T. brasiliensis</i>	<i>T. lenti</i>	<i>T. sherlocki</i>
100 pb	x			x		
150 pb				x		
180 pb	x				x	x
200 pb		x		x	x	x
250 pb	x	x	x			
300 pb				x	x	
400 pb				x	x	x

Nota: fragmento amplificado (x)

Este trabalho contribuiu com a deposição de novas sequências de DNA em banco de dados (GenBank), em um total de 16 novas sequências, de sete táxons, até o momento, sendo que pela primeira vez foram analisadas sequências de DNA de exemplares da espécie *T. melanocephala*.

IV. 4.3.5 – Análise filogenética das espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*

Dentre as espécies estudadas, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* apresentaram grandes dúvidas em relação ao seu agrupamento junto às espécies do subcomplexo *T. brasiliensis*, bem como ao seu posicionamento filogenético. Foi conduzida a reconstrução filogenética deste grupo, por meio da metodologia de máxima parcimônia e análise Bayesiana, na qual pode-se unir os fragmentos (concatenar), refinando as análises. Foram analisados os fragmentos 16S, Cytb e COI das espécies *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, além de outras espécies com sequências disponíveis em banco de dados (Tabela 8).

As análises filogenéticas sugerem a divisão das espécies de Triatominae em quatro subgrupos com maior suporte, denominados A, B, C e D, mas o presente conjunto de dados não apresenta uma forte evidência sobre as relações entre estes clados (Figura 31). A maioria das espécies de *Triatoma* sul-americanas distribuíram-se nos clados D (subcomplexo *T. infestans*), A (subcomplexo *T. brasiliensis*) e B (subcomplexos *T. maculata*, *T. matogrossensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*). No entanto, as espécies sequenciadas nesse trabalho, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* foram recuperados com o forte apoio dentro clade C (Probabilidade posterior Bayesian - BPP = 99%), junto a outros membros da tribo Triatomini (*Dipetalogaster* e *Panstrongylus*), e outros agrupamentos de espécies de *Triatoma* da América do Norte, como o subcomplexo *T. phyllosoma* (por vezes, tratada como gênero *Meccus*) e o complexo *T. lecticularia*, bem como o complexo *T. spinolai* (também por vezes tratados como gênero *Mepraia*) com espécies chilenas.

Tabela 8: Códigos de acesso dos fragmentos mitocondriais (16S, Cytb e COI) para os triatomíneos utilizados na reconstrução filogenética. As espécies foram divididas em grupos de acordo com a os dados recuperados nas analyses (Figura 31). Em negrito estão as novas sequências depositadas no GenBank.

(Sub)complexo	Espécies	Grupos	16S	Cytb	COI
<i>T. brasiliensis</i>	<i>T. brasiliensis</i>	A	EU827222	FJ623064	AF021186
	<i>T. juazeirensis</i>	A	KF769453	AY494169	AF826892
	<i>T. melanica</i>	A	KF769454	AY336527	AF826891
	<i>T. melanocephala</i> M1	C	KF769452	KF826898	AF826893
	<i>T. melanocephala</i> M2	C	KF769450	KF826899	AF826894
	<i>T. melanocephala</i> M3	C	KF769451	KF826900	AF826895
	<i>T. sherlocki</i>	A	EU489057	EU489058	KC608987
	<i>T. tibiamaculata</i>	C	AY185843	KF826897	AF826890
	<i>T. vitticeps</i>	C	EU827202	KF826896	AF021219
<i>T. dimidiata</i>	<i>T. dimidiata</i>	C	AY062138	JN585910	AF301594
<i>T. infestans</i>	<i>T. delpontei</i>	D	AF324520	HQ333241	FJ439768
	<i>T. infestans</i>	D	EU143699	AY702023	AF021199
	<i>T. platensis</i>	D	AF028744	-	AF021202
<i>T. lecticularia</i>	<i>T. rubida</i>	C	AY185842	DQ198810	DQ198800
<i>T. maculata</i>	<i>T. maculata</i>	B	EU827231	KC608977	AF449139
	<i>T. pseudomaculata</i>	B	EU827225	KC608979	KC608986
<i>T. matogrossensis</i>	<i>T. guazu</i>	B	KC571994	KC608976	KC608984
	<i>T. matogrossensis</i>	B	KC571995	KC608978	KC608985
	<i>T. vandae</i>	B	KC571997	-	KC608989
	<i>T. williami</i>	B	KC571998	KC608981	KC608990
<i>T. phyllosoma</i> (= <i>Meccus</i>)	<i>Mec. longipennis</i>	C	-	DQ198815	DQ198804
	<i>Mec. mazzotti</i>	C	AY035446	AY859421	DQ198805
<i>T. rubrovaria</i>	<i>T. circummaculata</i>	B	AF021188	-	AF021191
	<i>T. rubrovaria</i>	B	AF021203	GQ398003	AF021204
<i>T. sordida</i>	<i>T. garciabesi</i>	B	AY185835	-	EF451041
	<i>T. sordida</i>	B	KC571996	KC608980	KC608988
<i>M. spinolai</i> (= <i>Mepraia</i>)	<i>Mep. gajardoi</i>	C	-	JN102359	-
	<i>Mep. spinolai</i>	C	AY035467	JN102358	-
	<i>T. eratyrisiformis</i>	C	AY035466	JN102360	-
Outgroups	<i>Rhodnius neglectus</i>	-	AF045704	AF045716	EU444068
	<i>Rhodnius prolixus</i>	-	AF045707	EF011726	AF449138
	<i>Dipetalogaster maximus</i>	C	-	AF045728	-
	<i>Panstrongylus herreri</i> (= <i>P. lignarius</i>)	C	AY185833	-	AF449141
	<i>Panstrongylus megistus</i>	C	AF045701	AF045722	AF021179

(-) fragmento não avaliado.

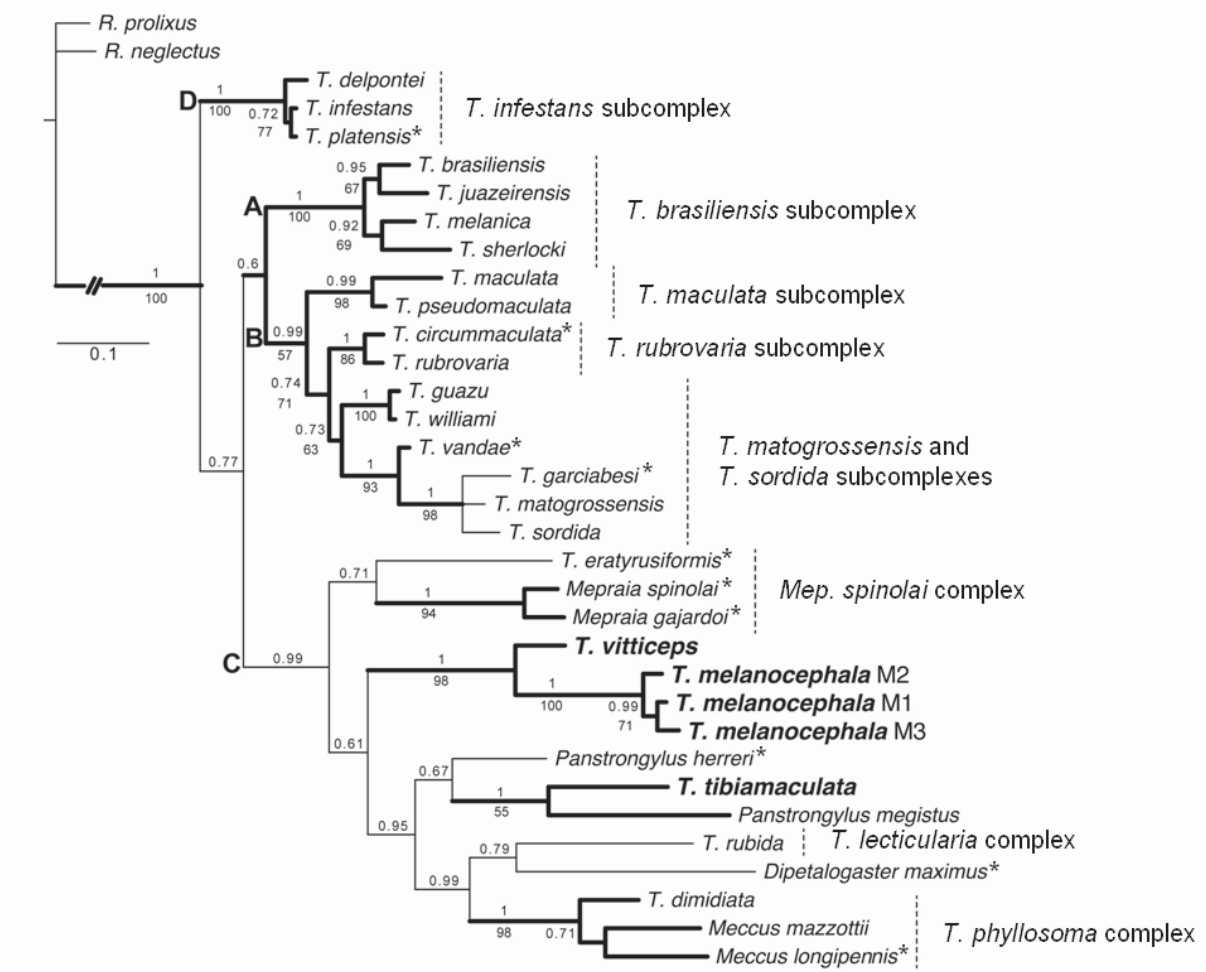


Figura 31: Filograma da distribuição das espécies do G3 (em negrito), com enfoque nas populações de *T. melanocephala* (M1, M2 e M3).

Em relação às espécies focadas neste trabalho que se apresentam no clado C, *T. vitticeps* foi recuperado como irmã para populações de *T. melanocephala* com alto apoio (BPP = 100%, BP = 98). Além disso, a inferência bayesiana recuperou *T. tibiamaculata* como a irmã de *Panstrongylus megistus*, com forte apoio (BPP = 99%). A divergência entre as espécies agrupadas no clado C, definitivamente apresentam divergências mais altas do que entre as espécies recuperadas nos outros grupos (A, B e D), como pode-se observar nas porcentagens relativas a distância-p (Figura 32, Tabela 9).

A porcentagem de divergência interespecífica entre cada um dos pares (distância-p) foi avaliada pelo programa Mega 5 e pode ser observada na tabela 9. Entre as populações de *T.*

melanocephala essa distância variou entre 0,8 % (M1 versus M3) e 1,2% (M2 versus M3 e M1), com relação ao fragmento 16S; para o Cytb a variação ficou entre 0,3% (M1 versus M3) e 4,1% (M2 versus M1), e para o fragmento COI, variou de 4,8% (entre M1 vs M2) para 10,8% (M3 vs M2) (Tabela 9). Dado que a distância geográfica entre M1-M2, M2-M3 e M1-M3 são respectivamente de 73,9 km, 80,4 km e 22,0 km, a divergências intra-específicas encontrada para os pares estão de acordo com as distâncias geográficas lineares (Figura 31).

Tabela 9: Distância genética (em porcentagem) entre as espécies avaliadas na reconstrução filogenética (Distância-p), com base em cada um dos fragmentos de gene concatenados (16S, Cytb e COI).

16S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1 <i>T.brasiliensis</i>																													
2 <i>T.circummaculata</i>	4,6																												
3 <i>T.dimidiata</i>	7,2	7,7																											
4 <i>T.delpontei</i>	6,3	6,7	6,4																										
5 <i>T.eratyrusiformis</i>	12,4	9,5	13,9	13,3																									
6 <i>T.garciabesi</i>	8,9	9,0	10,5	9,0	15,3																								
7 <i>T.guazu</i>	3,7	4,5	6,8	5,8	12,8	5,0																							
8 <i>T.infestans</i>	5,9	6,3	5,9	0,8	12,8	8,5	5,4																						
9 <i>T.maculata</i>	5,8	6,7	7,7	6,3	12,9	7,6	4,5	5,9																					
10 <i>T.matogrossensis</i>	8,1	7,2	9,6	8,6	15,3	2,4	5,0	8,1	7,6																				
11 <i>T.melanocephalaM1</i>	9,1	11,9	8,2	8,2	14,3	11,9	9,6	7,7	10,0	13,3																			
12 <i>T.melanocephalaM2</i>	8,2	11,0	8,2	8,1	13,8	11,9	9,5	7,7	9,1	12,4	1,2																		
13 <i>T.melanocephalaM3</i>	9,1	11,9	8,2	8,2	14,3	11,9	9,6	7,7	10,0	13,3	0,8	1,2																	
14 <i>T.platensis</i>	5,9	6,3	5,9	0,8	12,8	8,5	5,4	0,0	5,9	8,1	7,7	7,7	7,7																
15 <i>T.pseudomaculata</i>	5,4	6,3	7,2	5,9	12,4	7,1	4,1	5,4	0,4	7,1	9,6	8,7	9,6	5,4															
16 <i>T.rubida</i>	10,5	9,2	6,4	11,5	13,5	10,1	8,2	11,0	10,1	9,6	11,0	10,1	11,0	11,0	9,6														
17 <i>T.rubrovaria</i>	4,6	2,0	7,2	6,3	9,9	8,5	3,3	5,9	6,3	6,8	11,0	10,0	11,0	5,9	5,8	8,7													
18 <i>T.sherlocki</i>	0,8	5,0	7,7	6,3	12,4	8,0	3,7	5,9	5,0	8,0	9,1	8,2	9,1	5,9	4,5	11,0	5,0												
19 <i>T.sordida</i>	7,2	8,1	11,0	9,9	14,8	2,8	4,1	9,5	7,6	2,8	12,4	11,5	12,4	9,5	7,2	10,1	6,8	7,2											
20 <i>T.tibiamaculata</i>	12,0	11,4	7,3	12,5	11,5	13,9	11,9	12,0	9,1	13,4	12,1	11,2	12,1	12,0	8,7	9,1	10,0	12,5	13,0										
21 <i>T.vitticeps</i>	6,8	8,1	7,2	7,6	13,3	10,4	6,8	7,2	7,2	9,0	6,3	5,4	6,3	7,2	6,8	8,6	8,6	7,7	9,1	10,1									
22 <i>T.vandae</i>	7,6	6,8	9,6	8,6	14,8	2,8	4,5	8,1	7,1	1,2	13,3	12,4	13,3	8,1	6,7	9,2	6,3	7,6	2,4	12,9	9,0								
23 <i>T.williami</i>	3,7	4,1	7,7	6,7	11,9	6,2	1,2	6,3	4,1	5,4	10,5	9,5	10,5	6,3	3,7	8,2	2,9	4,1	4,6	11,0	6,8	5,0							
24 <i>D.maximus</i>	7,7	10,0	8,7	11,9	15,4	13,8	10,9	11,4	10,5	13,8	10,6	9,7	10,6	11,4	10,0	9,9	11,4	7,7	13,3	11,5	8,2	13,3	10,9						
25 <i>Mec.mazzottii</i>	11,9	11,5	5,4	10,1	14,5	13,0	9,6	9,6	10,5	12,1	11,5	12,0	11,5	9,6	10,1	10,1	11,0	12,5	13,5	10,6	8,7	12,1	10,5	13,0					
26 <i>Mep.spinolai</i>	10,5	12,9	10,2	13,0	11,4	14,9	12,0	12,5	12,0	15,9	10,6	9,7	10,6	12,5	11,5	11,1	11,5	10,6	14,0	12,1	11,0	15,4	12,0	12,0	14,2				
27 <i>P.herrerri</i>	10,5	10,5	8,7	11,0	10,0	14,8	12,8	10,6	11,4	14,8	11,5	10,6	11,5	10,6	11,0	11,0	11,9	10,5	14,3	8,2	10,5	14,3	12,8	10,1	12,1	10,6			
28 <i>P.megistusus</i>	12,4	13,5	11,6	14,6	14,9	16,4	13,9	14,0	11,5	14,5	13,9	13,0	13,9	14,0	11,1	13,6	14,5	12,5	17,0	10,7	11,1	15,0	13,0	12,6	13,3	15,9	10,9		
29 <i>R.neglectus</i>	24,2	27,7	21,2	25,3	30,0	26,3	23,7	24,7	24,8	27,4	24,8	25,4	25,4	24,7	24,2	23,8	27,1	24,9	28,6	24,9	25,1	27,4	23,7	28,2	26,1	26,1	28,0	28,8	
30 <i>R.prolixus</i>	23,1	24,8	19,0	23,0	28,1	23,9	21,4	22,4	22,5	25,0	22,5	23,0	23,1	22,4	21,9	22,7	24,2	23,7	26,2	23,7	22,7	25,0	21,4	27,0	23,7	24,3	26,1	26,4	3,3

Tabela 9 (Cont.)

Cytb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1 <i>T.brasiliensis</i>																											
2 <i>T.delpontei</i>	17,2																										
3 <i>T.dimidiata</i> 1	28,7	23,8																									
4 <i>T.eratyrusiformis</i>	23,1	17,9	25,4																								
5 <i>T.guazu</i>	19,0	18,5	24,9	22,4																							
6 <i>T.infestans</i>	15,9	2,7	22,8	17,4	18,1																						
7 <i>T.maculata</i>	15,8	16,4	25,4	21,1	12,2	16,0																					
8 <i>T.matogrossensis</i>	19,0	20,6	29,0	20,1	14,8	20,1	14,9																				
9 <i>T.melanocephala</i> M1	23,6	24,9	25,7	21,4	23,5	23,5	20,1	22,8																			
10 <i>T.melanocephala</i> M2	25,9	25,8	28,0	21,4	25,2	24,4	22,2	23,3	4,1																		
11 <i>T.melanocephala</i> M3	23,6	24,4	25,2	20,9	23,4	23,0	19,6	22,3	0,3	3,7																	
12 <i>T.pseudomaculata</i>	15,4	15,9	25,9	20,6	12,6	15,5	0,3	14,5	20,2	22,3	19,7																
13 <i>T.rubida</i>	20,1	21,5	19,4	22,3	25,2	20,2	25,9	29,4	25,8	25,2	25,2	25,3															
14 <i>T.rubrovaria</i>	17,4	14,7	24,3	15,4	11,9	14,3	11,8	13,0	24,8	23,8	24,2	11,4	24,2														
15 <i>T.sherlocki</i>	13,9	17,8	26,6	24,8	19,8	18,2	17,0	21,6	23,8	26,0	23,7	17,4	20,2	21,0													
16 <i>T.sordida</i>	20,7	22,8	33,6	20,5	16,6	20,7	17,4	7,2	26,8	27,1	26,2	16,9	30,5	15,4	22,6												
17 <i>T.tibiamaculata</i>	22,9	16,8	20,2	24,5	22,4	16,3	22,4	25,7	28,4	27,9	27,8	21,9	17,8	23,0	22,0	27,1											
18 <i>T.vitticieps</i>	26,2	20,6	24,4	20,8	21,6	19,3	21,2	24,6	14,6	15,3	14,2	21,3	26,7	23,4	22,8	22,9	20,9										
19 <i>T.williami</i>	19,4	18,0	25,4	21,8	1,0	17,6	12,6	13,6	24,0	25,2	23,5	12,1	24,6	11,5	21,2	15,3	21,0	21,6									
20 <i>D.maximus</i>	27,7	27,7	23,9	26,5	27,5	26,8	28,9	27,9	27,5	26,6	26,9	29,0	22,2	28,3	26,3	30,5	24,4	24,4	26,6								
21 <i>Mec.longipennis</i>	28,7	22,4	13,4	24,3	30,0	22,8	25,5	25,3	23,0	24,3	22,5	25,6	23,4	26,6	27,7	27,9	19,8	21,0	30,0	22,8							
22 <i>Mec.mazzottii</i>	26,8	21,1	11,0	25,6	24,0	20,1	22,9	28,5	28,1	30,4	27,5	23,4	23,8	23,6	27,1	30,0	20,8	24,3	23,6	24,2	13,7						
23 <i>Mep.gajardoi</i>	19,8	20,7	24,4	20,5	21,9	20,6	22,6	24,9	22,6	23,5	22,5	22,1	22,9	19,8	21,5	28,2	22,1	18,7	22,3	25,1	25,0	22,9					
24 <i>Mep.spinolai</i>	18,8	20,6	23,5	19,1	20,2	18,8	20,3	24,1	20,2	21,1	20,2	19,9	22,4	19,7	19,2	27,3	22,4	19,1	20,6	24,6	26,9	22,5	6,5				
25 <i>P.megistus</i>	21,3	21,8	27,9	22,5	22,8	22,2	20,8	24,9	24,8	24,7	24,3	20,3	24,8	22,8	26,3	27,2	19,1	22,4	21,4	26,7	26,4	25,8	23,2	23,1			
26 <i>R.prolixus</i>	24,9	21,7	27,4	23,1	23,1	21,7	21,7	27,9	30,8	31,6	30,2	21,2	29,3	22,2	26,5	26,9	24,0	28,0	22,5	28,1	32,1	28,6	26,5	30,3	25,7		
27 <i>R.neglectus</i>	27,7	23,5	27,4	23,5	24,3	21,7	23,9	28,8	30,2	28,9	29,6	23,4	26,3	23,6	26,6	27,5	23,6	29,1	23,7	28,9	32,5	29,6	28,6	29,1	26,1	6,9	

Tabela 9 (Cont.)

COI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 <i>T.brasiliensis</i>																											
2 <i>T.circummaculata</i>	15,5																										
3 <i>T.delpontei</i>	19,8	18,1																									
4 <i>T.dimidiata</i>	25,5	24,5	28,6																								
5 <i>T.garciabesi</i>	16,4	13,0	22,7	22,8																							
6 <i>T.guazu</i>	12,5	8,7	17,2	24,0	13,7																						
7 <i>T.infestans</i>	20,4	15,0	4,8	25,7	22,1	17,8																					
8 <i>T.maculata</i>	19,2	21,6	25,2	21,5	18,4	20,9	24,6																				
9 <i>T.matogrossensis</i>	20,3	13,5	25,1	21,4	7,6	14,2	25,8	18,9																			
10 <i>T.melanocephalaM1</i>	27,9	23,9	30,8	24,8	20,7	23,3	31,3	25,5	23,3																		
11 <i>T.melanocephalaM2</i>	27,6	23,6	31,9	22,7	19,4	22,9	29,5	27,3	23,6	4,8																	
12 <i>T.melanocephalaM3</i>	32,7	28,6	35,2	27,0	26,3	29,3	32,8	30,0	29,1	8,3	10,8																
13 <i>T.platensis</i>	19,1	15,0	3,7	26,4	20,6	16,4	1,0	24,4	24,3	30,6	28,8	33,5															
14 <i>T.pseudomaculata</i>	17,5	10,4	18,4	21,7	16,6	11,1	15,1	22,3	18,5	21,4	20,7	24,9	16,4														
15 <i>T.rubida</i>	22,1	20,3	24,1	18,0	22,5	20,5	22,7	22,1	22,5	23,8	23,4	29,4	22,6	19,1													
16 <i>T.rubrovaria</i>	12,4	2,6	18,9	21,6	12,3	9,2	15,8	20,2	14,1	23,2	21,4	27,9	15,7	9,8	18,2												
17 <i>T.sherlocki</i>	7,6	16,8	19,8	25,7	17,9	17,8	19,1	22,0	22,0	31,5	30,2	37,2	17,8	18,8	23,0	15,0											
18 <i>T.sordida</i>	18,2	11,6	23,5	22,1	8,1	13,4	22,9	16,9	5,8	22,7	22,9	27,7	21,5	14,7	23,0	12,2	19,8										
19 <i>T.vitticeps</i>	22,4	19,8	26,0	21,6	18,5	24,5	23,4	19,1	23,2	14,3	13,1	16,7	23,2	21,1	15,9	17,7	24,8	19,3									
20 <i>T.tibiamaculata</i>	24,9	27,6	23,4	16,6	28,0	24,9	23,2	17,1	27,8	26,3	27,4	28,4	23,9	23,4	20,8	26,8	27,1	29,2	21,6								
21 <i>T.vandae</i>	16,3	6,9	16,4	23,2	12,3	8,2	15,8	20,9	11,6	23,5	23,9	30,4	14,5	10,0	18,3	7,6	16,4	11,0	23,3	26,3							
22 <i>T.williami</i>	14,3	8,1	17,8	24,0	14,3	1,6	18,4	20,9	14,8	22,0	21,6	29,3	17,1	10,5	20,5	8,7	19,7	12,9	24,5	26,3	7,6						
23 <i>Mec.longipennis</i>	26,4	22,9	29,0	11,2	20,4	23,7	26,1	22,6	21,6	20,2	18,5	25,8	25,4	22,9	20,7	22,0	25,2	18,9	19,5	20,9	22,9	22,4					
24 <i>Mec.mazzottii</i>	25,9	24,7	27,2	12,4	22,5	26,0	25,8	20,5	23,7	23,7	21,9	24,8	25,7	23,3	18,1	23,0	24,0	22,9	19,3	19,2	24,0	26,0	11,7				
25 <i>P.herrerri</i>	21,3	19,8	22,8	16,6	18,1	19,8	22,3	18,4	16,7	23,4	23,2	26,9	22,1	21,2	15,8	18,5	24,5	18,5	18,5	18,9	16,7	19,8	16,5	15,9			
26 <i>P.megistus</i>	23,3	21,2	25,5	15,2	21,6	23,9	22,7	15,9	21,4	22,9	24,1	24,6	23,3	22,0	24,5	21,2	23,6	20,5	22,7	13,0	19,3	21,9	15,7	15,1	15,9		
27 <i>R.neglectus</i>	27,1	28,6	25,5	27,4	30,4	28,1	25,0	24,8	32,4	30,0	29,7	31,3	25,6	29,0	25,5	27,9	28,5	29,2	24,3	23,1	28,6	28,1	23,0	25,4	26,4	21,4	
28 <i>R.prolixus</i>	25,9	27,0	24,9	26,7	27,0	26,5	24,1	29,0	29,0	29,2	27,4	30,4	23,5	28,8	21,0	26,3	26,8	25,9	22,1	23,7	27,0	26,5	22,4	24,0	26,3	23,3	7,0

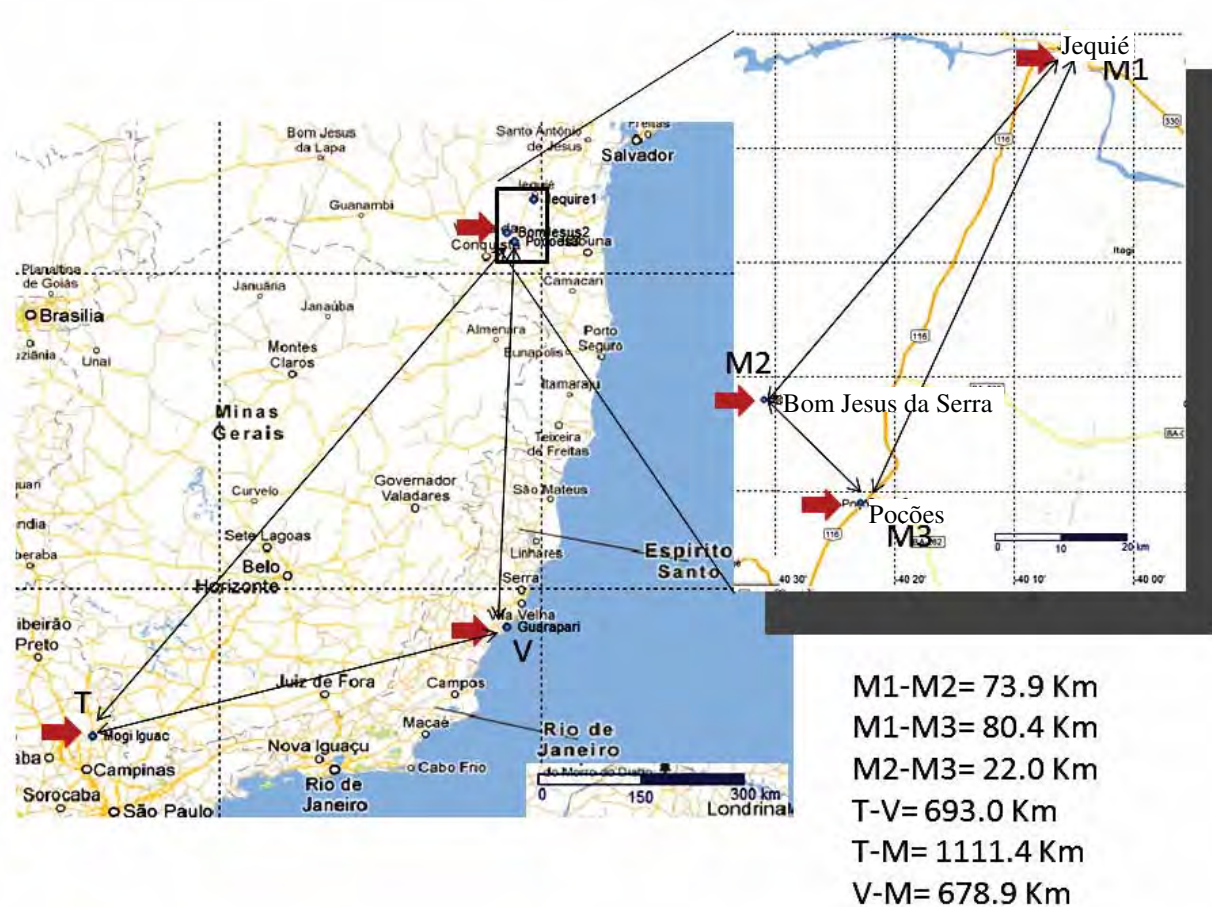


Figura 32: Mapa da localização de coleta das espécies utilizadas no grupo G3, com enfoque nas populações de *T. melanocephala* (M1, M2 e M3).

V. DISCUSSÃO

O genoma mitocondrial evolui dez vezes mais rápido que o nuclear e quanto maior a taxa evolutiva do gene, maior a capacidade de avaliar a divergência de organismos mais próximos (García et al., 2001; Martinez et al., 2006). Já o genoma nuclear se torna interessante para avaliar organismos que divergiram há mais tempo (Abad-Franch e Monteiro, 2005). Com o alinhamento das sequências (pareamento de sítios homólogos) foi possível observar e analisar os sítios homólogos e com isso, as regiões polimórficas e conservadas de cada fragmento de gene (Pavan e Monteiro, 2007).

Assim, os marcadores avaliados foram selecionados de acordo com os resultados obtidos com as análises de sequências retiradas do *GenBank*®. Foram avaliados vários fragmentos para cada grupo, no entanto, os que se mostraram mais adequados ao desenho dos *primers* foram Cytb para G1 e 16S para G3.

Com relação ao G2, até o momento não foram encontrados marcadores adequados ao desenho de *primers*, pois os fragmentos mitocondriais (16S, 12S, Cytb e COI) e nucleares (ITS1 e ITS2) avaliados mostraram-se bastante conservados e com alto grau de similaridade entre as sequências de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e, dessa forma, não foi definido um fragmento adequado ao desenho de *primers* específicos para essas duas espécies.

No alinhamento das sequências do fragmento Cytb para o G1, pode-se observar a variação entre 369 sítios homólogos. Nesse alinhamento podem ser observadas várias regiões polimórficas e bem distribuídas ao longo do fragmento sequenciado. No entanto, esse é um fragmento que apresenta um alto grau de sítios homoplásicos. As homoplasias são o resultado de uma similaridade não homóloga, com caracteres compartilhados por algumas espécies, que não estavam presentes no ancestral comum. Isso se deve a um processo de evolução independente, o que pode fornecer uma falsa evidência em termos filogenéticos e dificultar o desenho de *primers* para a identificação de espécies.

Com relação ao G3, o fragmento 12S demonstrou um bom número de sítios polimórficos, bem distribuídos pela sequência e em boa quantidade, o que indica um bom fragmento para o desenho de novos *primers* específicos. No entanto, o fragmento 16S, além de apresentar um bom número de regiões polimórficas e em disposição favorável ao desenho de *primers* específicos, apresentou maior número de sequências disponíveis para comparação. Assim, o fragmento 16S foi escolhido para dar sequência aos experimentos desse grupo. Com relação ao fragmento 16S, observam-se algumas regiões polimórficas, mas em menor quantidade, quando se compara com o fragmento Cytb, o que caracteriza esse fragmento com um bom sinal filogenético. Ainda assim, esse fragmento apresenta sítios polimórficos bastante dispersos, que indicam tanto variações entre as espécies como entre exemplares de uma mesma espécie, o que pode dificultar o desenho de *primers* específicos.

Outra observação sobre o fragmento 16S é que, para o G2, os sítios polimórficos são bastante raros e condizem a variações pontuais intraespecíficas. Para esse grupo, o fragmento 16S é bastante conservado e não oferece divergências significativas entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

O fragmento 16S para o G3 mostrou-se bastante adequado ao desenho dos *primers*, pois o alinhamento apontou várias regiões polimórficas e conservadas, o que favoreceu o desenho tanto de *primers* universais, quanto específicos. O filograma das espécies desse grupo baseado no fragmento 16S mostrou um bom agrupamento das espécies avaliadas, pois *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, apresentam divergências suficientes para separá-las nessa análise. Esse resultado corrobora a proposta de ser um fragmento adequado ao desenho de *primers* específicos para as espécies desse grupo.

Os *primers* desenhados foram obtidos por meio da avaliação das sequências obtidas para o fragmento 16S com relação às espécies agrupadas em G3. Assim, as regiões conservadas foram utilizadas para o desenho dos *primers* universais F1 e R6 (que servem a

todos os exemplares avaliados) e as polimórficas, para o desenho dos *primers* específicos R1, R2, R3, R4, R5 (que identificariam as espécies). A análise virtual dos *primers* desenhados foi realizada por meio do programa *OligoAnalyzer 3.1*, onde observou-se o tamanho, temperatura de *melting* (TM) e a porcentagem de CG (citosina e guanina) de cada *primer* desenhado, com isso, podem-se avaliar sua qualidade e funcionalidade.

A TM indica a temperatura de reação na qual, metade das fitas de DNA, estará na forma de fita simples e a outra metade na de dupla-hélice. Essa informação é necessária para indicar em qual temperatura ocorrerá o pareamento (anelamento) do *primer* à fita de DNA molde, geralmente ocorre em torno de quatro graus Celsius abaixo da TM (TM – 4°C). Se a temperatura de anelamento é baixa, o *primer* se torna menos específico e pode parear com outras regiões, amplificando fragmentos indesejados; e se for muito elevada, o *primer* pode não parear e, assim, não há amplificação.

O tamanho do *primer* tem ligação direta com a especificidade do mesmo. Quanto mais longo é um *primer*, mais específico ele será, ou seja, maior a probabilidade de existir apenas um sítio de ligação no genoma avaliado. No entanto, quanto mais longo um *primer* maior a TM e, conseqüentemente, maior a temperatura de anelamento. *Primers* muito curtos tornam-se inespecíficos, podendo amplificar fragmentos aleatórios. Esse é o princípio da PCR – RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), que amplifica fragmentos aleatórios e gera padrões de bandas distintos para os grupos avaliados. No entanto, não é o objetivo deste trabalho, assim as tentativas de desenho de *primers* seguirão em torno de 18 a 28 pb.

A composição das bases de um *primer* e, principalmente, a porcentagem de CG indicam qual o grau de ligações de hidrogênio. Citosina e guanina apresentam ligações mais fortes e estáveis que timina e alanina. Assim, quanto maior a porcentagem de CG no *primer*, maior a necessidade de energia para romper as ligações e maior a TM e a temperatura de anelamento. Portanto, a quantidade de CG no *primer* deve estar ente 50% e 60% das bases,

para que se obtenha uma TM favorável. No entanto, os *primers* desenhados apresentam variações com relação a esses parâmetros. Os *primers forward* apresentaram melhor desempenho virtual que os *primers reverse*. No entanto, a porcentagem de CG ainda está baixa, entre 30% e 55% para *forward* e entre 21% e 42% para *reverse*.

Os testes com os *primers* propostos para o gênero *Rhodnius* demonstraram bons resultados no que diz respeito à diferenciação das espécies *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. robustus*, pois cada espécie apresentou um padrão distinto. Da mesma forma, os *primers* propostos para a diferenciação de espécies do G3, apresentaram um excelente desempenho durante a avaliação da *Nested PCR-multiplex*, e, assim, foi possível diferenciar *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*, por meio da comparação dos diferentes padrões de amplificação. Assim, essa metodologia mostrou-se como uma eficiente ferramenta para auxiliar na identificação das espécies avaliadas.

Para as análises de distância foi utilizado o algoritmo NJ, uma metodologia bastante simples que gera o filograma (árvore filogenética), com base na distância genética dos organismos avaliados e se baseia em calcular par-a-par a distância genética entre as sequências, e, com base nisso, construir a topologia (Pinteiro et al., 2005). Esse método depende pouco tempo de análise e pode ser aplicada a bases de dados bastante extensas. No entanto, utiliza-se de matrizes para gerar o filograma, assim, não considera os dados originais, e sim as distâncias entre eles.

As análises de distância genética são realizadas com base em uma matriz de dados, que pode ser gerada a partir de vários parâmetros. Assim utilizou-se o algoritmo Kimura de dois parâmetros (Kimura 2) para gerar a matriz de distância genética necessária para a construção do filograma. Essa metodologia considera as mutações do tipo transições (purina-purina ou pirimidina-pirimidina) mais prováveis de ocorrer do que as transversões (purina-pirimidina ou pirimidina-purina) (Kimura, 1980; Pinteiro et al., 2005).

Os filogramas analisados por meio da distância genética dos organismos se baseiam em calcular par-a-par a distância genética entre as sequências, e, a partir da matriz de distância constrói a topologia e gera o filograma (Pinteiro et al., 2005). Vale salientar que as análises geradas pelo algoritmo NJ indicam a distância genética ou porcentagem de divergência genética entre um grupo e seu ancestral comum, o que possibilita observar a formação dos clados associados relativos a um gene e, assim, avaliar se este gene é adequado ao desenho de *primers* específicos.

Vale salientar que as análises geradas pelo algoritmo NJ indicam a distância genética ou porcentagem de divergência genética entre um grupo e seu ancestral comum. Dessa forma, a barra de referência de distância inserida abaixo dos filogramas, indica que a porcentagem de divergência entre o táxon em questão e seu ancestral comum é proporcional ao comprimento do ramo (Saitou e Nei, 1987; Kumar et al., 2008).

Dessa forma, o filograma relativo às espécies do G1 baseado nos fragmentos *Cytb*, mostra que os exemplares de *R. robustus* não formam um único clado, ou seja, nota-se um grande clado com haplótipos de *R. robustus*, provavelmente os grupos II, III e IV, e um outro clado com haplótipos de *R. robustus* (grupo I) entremeados junto aos de *R. prolixus* (Monteiro et al., 2003). Com relação ao posicionamento de *R. neglectus* na representação filogenética notam-se os haplótipos em um único clado, o que pode indicar a monofilia das populações dessa espécie.

Interessantemente, em uma tentativa de relacionar as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*, com outras do subcomplexo *T. brasiliensis* ou mesmo com triatomíneos da América do Sul, não se verificou proximidade durante as análises filogenéticas. De maneira semelhante, a definição do subcomplexo *T. brasiliensis* proposta por Schofield e Galvão (2009), foi recentemente questionada por estudos citogenéticos encabeçados por Alevi et al. (2012, 2013). Até o momento, apenas *T. brasiliensis*, *T.*

juazeirensis, *T. melanica* e *T. sherlocki* foram considerados como um grupo monofilético com base na análise dos genes citocromo b (Cytb) e 16S (16S) (Monteiro et al., 2004; Mendonça et al., 2009). Levando em consideração que amostras de DNA de espécies silvestres são difíceis de ser obtidas, as definições de complexos e subcomplexos específicos tem se baseado principalmente em características morfológicas e ecológicas, o que demonstra a importância dessas análises por meio de três fragmentos de DNA de espécies brasileiras silvestres.

Panzer et al. (2010) agruparam os triatomíneos com base em sua estrutura cromossômica, inclusive membros do subcomplexo *T. brasiliensis* e Alevi et al. (2012, 2013) propuseram que *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* deveriam ser excluídas do subcomplexo *T. brasiliensis*, pois suas estruturas cariotípicas combinam com espécies de *Panstrongylus*, *Mepraia*, *Meccus*, e outras espécies de *Triatoma* da América do Norte. Baseados apenas em análises de distância de seqüências do gene 16S, Hypsa et al. (2002) haviam apontado a relação entre *T. tibiamaculata* e *Panstrongylus megistus*, distanciando-a das espécies do subcomplexo *T. brasiliensis*.

As novas seqüências geradas e a adição de várias espécies, que pertencem a diferentes grupos de *Triatoma* e aos outros gêneros de triatomíneos, compõem um conjunto de dados mais robusto para testar essa hipótese. Os resultados estão de acordo com os autores acima citados, pois tanto *T. tibiamaculata* como as espécies recém-sequenciadas *T. melanocephala* e *T. vitticeps* foram fortemente alocadas em um clado separado das demais espécies de *Triatoma* da América do Sul. Portanto, o subcomplexo *T. brasiliensis*, tal como atualmente definido por Schofield e Galvão (2009) não foi considerado como uma unidade monofilética, e, provavelmente, deve ser redefinido para incluir apenas as espécies *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki*, *T. petrochii* e *T. lenti*, embora a

posição das duas últimas espécies não tenha sido avaliada por outros elementos além da morfologia.

Experimentos de cruzamento detectaram a compatibilidade reprodutiva entre *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki* (Costa et al., 2003; Correia et al., 2013). Por outro lado, *T. petrochii* e *T. lenti* não apresentaram sucesso na produção de híbridos com *T. brasiliensis* (Espínola, 1971; Heitzmann-Fontenelle, 1984).

Com base nos novos dados, é proposta a exclusão das espécies *T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* e *T. vitticeps* do subcomplexo *T. brasiliensis*, corroborando os dados citogenéticos de Alevi et al. (2012). No entanto, não há um consenso sobre a classificação dessas espécies dentre os complexos e subcomplexos de triatomíneos, sendo necessária a inclusão de mais espécies de *Triatoma*, tanto da América do Sul, como da América do Norte e outros gêneros de triatomíneos, bem como a avaliação de mais genes.

Reforçando a necessidade de uma revisão do gênero do *Triatoma* Hypsa et al. (2002), com base na análise de sequências 16S, indicou que esse gênero seria parafilético, assim como de outros gêneros, dentre eles *Linshcosteus*, *Dipatologaster*, *Eratyrus* e *Panstrongylus*. A parafilia foi observada principalmente com relação ao posicionamento dos membros de *Triatoma* da América do Norte, como os subcomplexos *T. phyllosoma* e *T. protracta* e o gênero “*Meccus*”, o complexo *T. flavida* nas Antilhas (às vezes tratado como “*Nesotriatoma*”), o “*Mepraia*” no Chile, bem como, o complexo *T. rubrofasciata*. Nas análises de Hypsa e colaboradores (2002), no entanto, 16S rDNA por si só não apresentou suporte no posicionamento de *T. vitticeps*, mas a análise de parcimônia de 16S combinados, 12S rDNA, e COI colocou essa espécie em relação ao clado sul-americano. No presente estudo, a inclusão de sequências do Cytb, combinado com 16S e COI, adiciona ao grupo de triatomíneos da América do Norte, as três espécies Sul-americanas (*T. tibiamaculata*, *T. melanocephala* e *T. vitticeps*), o que também confirma a parafilia deste

gênero. Em particular, neste estudo, *Panstrongylus* foi considerado como um grupo parafilético em relação a *T. tibiamaculata*, e esse achado deve ser subsidiado por novos estudos morfológicos, para avaliar uma futura revisão dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma*.

A acumulação crescente de dados de sequências de DNA, auxilia na proposição de hipóteses filogenéticas mais robustas, o que reforça, cada vez mais, a necessidade de uma revisão dos gêneros e das espécies de triatomíneos, em especial do gênero *Triatoma*. Essa revisão deve abordar não só a definição de complexos de espécies e subcomplexos, mas também quais espécies poderiam ser incluídas em outros gêneros de triatomíneos.

VI. CONCLUSÕES

Os novos *primers* propostos, com base nos fragmentos Cytb e 16S, assim como as reações de *PCR-Multiplex* avaliadas, apresentaram sensibilidade no diagnóstico molecular das espécies *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. robustus* (fragmento Cytb), e também para *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* (fragmento 16S). A aplicação da reação de *PCR-Multiplex* para as espécies próximas às dos grupos avaliados, demonstrou especificidade das reações propostas.

Não foi possível estabelecer *primers* específicos que distingam *T. pseudomaculata* e *T. maculata*, por meio da análise dos fragmentos mitocondriais (16S, 12S, Cytb e COI) e nucleares (ITS1 e ITS2) avaliados.

A Análise Bayesiana indicou *T. vitticeps* como espécie irmã de *T. melanocephala* com alto suporte e *T. tibiamaculata* como irmã de *P. megistus* (BPP = 99%).

Com base nas análises filogenéticas de três fragmentos de DNA (16S, Cytb e COI), propomos a exclusão de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* do subcomplexo *T. brasiliensis*, pois essas espécies foram intimamente relacionadas com outros gêneros e espécies de triatomíneos com distribuição na América do Norte.

Este estudo corrobora as sugestões anteriores de parafilia do gênero *Triatoma* e salienta a necessidade de uma revisão dos gêneros e espécies de triatomíneos, tendo em conta os dados filogenéticos apontados.

VII. REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; DIOTAIUTI, L.; GURGEL-GONCALVES, R.; GURTLER, R.E. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 251-254, 2013.

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3 p. 437-454, 2005.

ACTIS, A. S.; TRAVERSA, O. C.; CARCAVALLO, R. U. Estudios taxonómicos sobre el género *Triatoma* Laporte mediante la electrophoresis de la linfa. **An. Esc. Nac. Ciencias Biol.**, v. 13. p. 97-106, 1964.

ALEVI, K.C.C., MENDONÇA, P.P., PEREIRA, N.P., ROSA, J.A., OLIVEIRA, M.T.V.A. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652–1653, 2012.

ALEVI, K.C.C., ROSA, J.A., OLIVEIRA, M.T.V.A. Mini Review: Karyotypic Survey in Triatominae Subfamily (Hemiptera, Heteroptera). **Entomol Ornithol Herpetol**, v. 2, n. 2, p. 106, 2013.

ALMEIDA, C. E.; PACHECO, R.S.; NOIREAU, F.; COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) I: Isoenzymatic and chromatic patterns of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 829-834, 2002.

ALMEIDA, C. E.; PACHECO, R. S.; HAAG, K.; DUPAS, S.; DOTSON, E. M.; COSTA, J. Inferring from the Cytb Gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Genetic Structure and Domiciliary Infestation in the State of Paraíba, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 5, p. 791–802, 2008.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora, Rio de Janeiro: 2008, 63 p.

BARGUES M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of Lymnaeid snails based on 18s rDNA sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v. 14, n. 5, p. 569-577, 1997

BARGUES, M.D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J.M.; DUJARDIN, J.P.; SCHOFIELD, C.J.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 567-573, 2000.

Begliomini, H. **Biografia – Carlos Chagas**. Disponível em: <http://www.academiamedicinasaopaulo.org.br/biografias/30/BIOGRAFIA-CARLOS-CHAGAS.pdf>. Acesso em: 12 mar 2013.

BORGES, E. C.; DUJARDIN, J.P.; SCHOFIELD, C.J.; ROMANHA, A.J.; DIOTAIUTI, L. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera:Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, p. 119-126, 2005.

BOS, D. H.; POSADA, D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 211–227, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Nota técnica – Doença de Chagas Aguda**. 2008a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf. Acesso em: 19 jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tabela de óbitos por Doença de Chagas Aguda (DCA). Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2005 – 2007**. 2008b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27881. Acesso em: 19 jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica - Caderno 10. Doença de Chagas (CID 10: B57)**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_doenca_de_chagas.pdf. Acesso em: 06 nov. 2012.

BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease. **Parasitology Today** 2, London: Elsevier Science, p.196-197, 1986.

CANALLE, D.M.; CECERE, M.C.; CHUIT, R.; GÜRTLER, R.E. Peridomestic distribution of *Triatoma garciabesi* and *Triatoma guasayana* in north-west Argentina. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 383–390, 2000.

CARCAVALLO, R. U.; MARTÍNEZ, A. M. Biología, ecología y distribución geográfica de los Triatomíneos Americanos (excepto *R. prolixus*, *P. megistus*, *T. dimidiata* y *T. infestans*) In: CARCAVALLO, R. U.; RABINOVICH, J. E.; TONN, R. J. **Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud., v.1, p.149-208, 1985.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the Triatominae. A General approach. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Rio de Janeiro: Fiocruz. 1999. p. 925-969, v. 3.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CORREIA, N., ALMEIDA, C.E., LIMA-NEIVA, V., GUMIEL, M., DORNAK, L.L., LIMA, M.M., MEDEIROS, L.M., MENDONÇA, V.J., ROSA, J.A., COSTA, J. Cross-mating experiments detect reproductive compatibility between *Triatoma sherlocki* and other members of the *Triatoma brasiliensis* species complex. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 162-167, 2013.

COSTA, J.; FREITAS-SIBAJEV, M.G.; MARCHON-SILVA, V.; PIRES, M.Q.; PACHECO, R.S. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 459-464, 1997.

COSTA, J.; ALMEIDA, J.R.; BRITTO, C.; DUARTE, R.; MARCHON-SILVA, V.; PACHECO, R.S. Ecotopes, natural infection, and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 7–13, 1998.

COSTA, J.; PETERSON, A. T. ; BEARD, C. B. Ecological niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, p. 516–520, 2002.

COSTA, J.; ALMEIDA, C.E.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 637–639, 2003.

COSTA, J.; ARGOLO, A.; FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva and Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 1385, p. 47-58, 2006.

COSTA, J.; FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 87-90, 2007.

COURA, J. R.; CANÇADO, J. R. **A história da terapêutica da doença de Chagas**. Ministério da Saúde – Fiocruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>. Acesso em: 25 jul. 2009.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 513-515, 1984.

Dias, J.C.P. **Controle da doença de Chagas no Brasil**. In: Silveira, A.C. El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2002, p. 145-250.

DIAS, J. C. P., SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.4, p. 373-383, 1998.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.1, p. S13-S22, 2007.

DIOTAIUTI L. O risco de domiciliação de novas espécies de triatomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.2, p.31-35, 2000.

DNDi, 2003. **Panorama**. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/sobre-a-dndi/panorama.html>. Acesso em: 15 set. 2012.

ESPÍNOLA, H.N. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto e Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.31, p.278-281, 1971.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.14, n.3, p. 964-998, 1980.

GALVÃO, A.B. *Triatoma brasiliensis* macromelasoma n. subsp. (Reduviidae, Hemiptera). **Revista Brasileira de Malariologia Doencas Tropicais**, v. 7, p. 455–457, 1956.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J.A. Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1-36, 2003.

GARCÍA, B. A.; MORIYAMA, E. N., POWELL, J. R. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. **Entomological Society of América**, v. 38, n. 5, p. 675-683, 2001.

GONÇALVES, T.C.M.; TEVES-NEVES, S.C.; DOS SANTOS-MALLET, J.R.; CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A.L.; LOPES, C.M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n. 4, p. 429-437, 2013.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A.T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

HALL, T. A.; BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v.41, p.95-98, 1999.

HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de triatomíneos. VII – *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v.48, p.183-188, 1984.

HOTEZ, P. J; DUMONTEIL, E.; WOC-COLBURN, E.; SERPA, J.A.; BEZEK, S.; WARDS, M.S.; HALLMARK, C.J.; MUSSELWHITE, L.W.; FLINK, B.J.; BOTTAZZI, M.E. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. **PLOS - Neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5 (e1498), p. 1-4, 2012.

HYPISA, V.; TIETZ, D.F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R.O.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2002.

JURBERG, J.; GALVÃO, C.; MONTEIRO, F.; LENT, H.; PANZERA, F. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martinez, Prosen, Ronderos, 1967 (HEMIPTERA-REDUVIIDAE). **Entomologia y Vectores**, v. 5, n. 3, p. 107-122, 1998.

JURBERG, J. Ferramentas usadas em taxonomia de triatomíneos o uso múltiplo. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 497-509, 2003.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-20, 1980.

KUMAR, S; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, p. 299-306, 2008.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.163, n.3, p.123-520, 1979.

LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). Jornal da Unicamp, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 11 a 17 de abril de 2005. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju283pag02.pdf. Acesso em: 4 set. 2007.

LYMAN, D. F.; MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D. M.; DUJARDIN, J. P., BEARD, C. B. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatomine vectors of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 377-386, 1999.

MARTÍNEZ, F. H.; VILLALOBOS, G.C.; CEVALLOS, A.M.; TORRE, P.D.E.L.; LACLETTE, J.P.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ESPINOZA, B. Taxonomic study of the *phyllosoma* complex and other triatomíneo (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mt Cytb sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, p. 279-287, 2006.

MENDONÇA, V.J.; DA SILVA, M.T.; DE ARAÚJO, R.F.; JÚNIOR, J.M.; JÚNIOR, M.B., ALMEIDA, C.E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M.A.S.; CICARELLI, R.M.,B.; DA ROSA, J.A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 460-465, 2000.

MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A., BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**, v.17, p. 344-347, 2001.

MONTEIRO, F. A.; LAZOSKI, C.; NOIREAU, F.; SOLÉ-CAVA, A.M. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, p. 83-90, 2002.

MONTEIRO, F.A.; BARRETT, T.V.; FITZPATRICK, S.; CORDON-ROSALES, C.; FELICIANGELI, D.; BEARD, C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Mol. Ecol.** v. 12, p. 997-1006, 2003.

MONTEIRO, F.A.; DONNELLY, M.J.; BEARD, C.B.; COSTA, J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. **Mol Phylogenet Evol**, v. 32, p. 46-56, 2004.

NAEGELE, M. P.; COSTA, P. I., ROSA, J. A. Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, p. 353-357, 2006.

NEIVA, A. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma*. **Brasil-Médico**, v. 25, p. 461-462, 1911.

NOIREAU, F.; SANTOS, S.M.; GUMIEL, M.; DUJARDIN, J.P.; SOARES, M.S.; CARCAVALLO, R.U.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogenetic relationships within the *oliveirai* complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Infection Genetics and Evolution**, v. 2, p. 1-17, 2002.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P., JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 26, 2009.

OLIVEIRA, A. W. S.; SILVA, I. G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 204-208, 2007.

PACHECO, R.S. ; ALMEIDA, C.E.; COSTA, J.; KLISIEWICZ, D.R.; MAS-COMA, S.; BARGUES, M.D. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). **Ann Trop Med Parasitol**, v. 97, p. 757-768, 2003.

PANZERA, F.; HORNOS, S.; PEREIRA, J.; CESTAU, R.; CANALE, D.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J.P.; PEREZ, R. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 732–739, 1997.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; PANZERA, Y.; FERRANDIS, I.; FERREIRO, M.J.; CALLEROS, L. Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 128, p. 77–87, 2010.

PAVAN, M.; MONTEIRO, F. A. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, p. 751-758, 2007.

PENARANDA-CARRILLO, R.; MOREIRA, E.F.; SILVEIRA, A.C.; LEITE, J.; VINHAES, M.C.; CASTRO, C.; MACÊDO, V.. Avaliação do impacto das ações de controle vetorial da doença de Chagas através do inquérito sorológico em Mambaí/Buritópolis, Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 331-338, 2002.

PINTEIRO, L. C.; VIANA, G. V. R.; GOMES, F. A. C.; VIANA, N. G. Técnicas Algorítmicas para Construção de Árvores Filogenéticas. **Revista Científica da Faculdade Lourenço Filho**, v. 4, n. 1, 2005.

ROSA, J.A.; ROCHA, C.S.; GARDIM, S.; PINTO, M.C.; MENDONÇA, V.J.; FERREIRA FILHO, J.C.R.; DE CARVALHO, E.O.C.; CAMARGO, L.M.A.; DE OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, p. 62–76, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–25, 1987.

SCAPELLATO, P. G., BOTTARO, E. G., RODRÍGUES-BRIESCHKE, M. T. Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 107-109, 2009.

SCHMUNIS, G. A., DIAS, J. C. P. La reforma del sector salud, descentralización prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.2, p.117-23, 2000.

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

SCHOFIELD, C.J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J.P. The process of domestication in triatominae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, sup.1, p. 375-378, 1999.

SHERLOCK, I. A., GUITTON, N. Fauna triatominae do Estado da Bahia, Brasil: IV - *Triatoma melanocephala* Neiva e Pinto, 1923. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p.3-4. 1980.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.; CARVALHO-PINTO, C.J.; GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectores, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Problemática vetorial da doença de Chagas. **Arq Ciênc Saúde**, v. 1, n. 1, p. 44-47, 2004

TARTAROTTI, E; CERON, C. R. Ribosomal DNA ITS-1 Intergenic Spacer Polymorphism in Triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Biochemical Genetics**, v. 43, n. 7/8, p. 365-373, 2005.

TORRES, L. D.; DIAS, J. C. P. **Triatomíneos e doença de Chagas: manual prático para identificação e manejo em laboratório**. Belo Horizonte : Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, 1982.

USINGER, R. L.; WYGODZINSKY, P., RYCKMAN, R. E. The biosystematics of Triatominae. **Annu. Revista Entomology**, v.11, p.309-330, 1966.

VIEIRA, C. Globalización, comercio internacional y equidad en materia de salud. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.11, p.425-429, 2002.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, sup. 2, p.7-12, 2000.

WHO. **Neglected tropical diseases**: Neglected tropical diseases, hidden success, emerging opportunities, 2009. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598705_eng.pdf. Acesso em: 05 set. 2012.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Fact sheet n.340, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em: 01 nov. 2012.

WHO. **Fact sheet – Chagas Disease**, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en>. Acesso em: 01 mar. 2013.

CAPÍTULO II

ARTIGOS



Short communication

A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto City, São Paulo, Brazil



Danila B. Carvalho^a, Carlos E. Almeida^a, Cláudia S. Rocha^a, Sueli Gardim^a, Vagner J. Mendonça^a, Aline R. Ribeiro^b, Zulimar C.P.V.T. Alves^c, Kellem T. Ruellas^d, Alan Vedoveli^d, João A. da Rosa^{a,*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, SP, Brazil

^b Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP – Campinas, SP, Brazil

^c Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) SR-06 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Vigilância Sanitária e Epidemiológica – Monte Alto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2013

Received in revised form 2 October 2013

Accepted 9 October 2013

Available online xxx

Keywords:

Triatomines

Domiciliation

Antropogenic changes

Vector behavior

ABSTRACT

After several public notifications of domiciliary invasions, palm trees were investigated in downtown Monte Alto City, São Paulo State, Brazil, in proximity to the city hall building, the main church, condominiums and marketing establishments. One hundred seventy four palm trees of 10 species were investigated, in which 72 specimens of *Rhodnius neglectus*, a potential Chagas disease vector, were captured via manual methods. All insects were collected from dead leaves, organic debris and bird nests in the only three *Livistona australis* palm trees in the central park square. This was the first record of *R. neglectus* colonizing this palm species. Although no *Trypanosoma cruzi* was found by abdominal compression followed by light microscopy, the poor nutritional status of the bugs hampered the examination of gut contents for parasite detection. Furthermore, the central crowns of the trees, which shelter bats (Chiroptera: Mammalia), could not be carefully searched for insects due to difficult access. This new finding highlights the sudden alteration in insect behavior, probably as a result of man's interference. This report aims to warn those involved in the health system about this new threat, justifying detailed research of the area to evaluate the magnitude of this emerging public health issue.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Chagas disease afflicts millions of people throughout Latin America, yet no vaccine has been developed. This disease is caused by a protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, transmitted to man mainly by infected blood-sucking bugs, the triatomines. It is estimated that between seven to eight million people carry Chagas disease, placing this illness among the most serious parasitic disease in the southern hemisphere (WHO, 2010). The epidemiological scenario for this disease is continuously changing, and recently, Abad-Franch et al. (2013) questioned the certification of the absence of Chagas disease transmission by native vectors in Brazil. In fact, in Ceará State, a domestic transmission cycle was disclosed as 20% of all dogs in one periurban locality were *T. cruzi* positive (Lima et al., 2012).

The establishment of endemic Chagas disease requires man/triatomine cohabitation in homes (Schofield and Galvão, 2009). Some species of *Rhodnius* adapt to domiciles (e.g. *Rhodnius prolixus*), whereas the majority are strictly sylvatic. *Rhodnius neglectus* may be in between these adaptation statuses, because colonies of this species have already been reported in domiciles of rural areas (Abad-Franch et al., 2009). However, the consensus is that even a sylvatic species represents a threat, as a population portion of these insects will naturally end up invading homes or landing on food, usually attracted by artificial lights (Abad-Franch et al., 2009; Gurgel-Gonçalves and Cuba, 2007). There is one hypothesis to explain the high indexes (in some spots over 10%) of human *T. cruzi* serological prevalence in the Amazon basin, as people may become infected by biting or accidentally, through infected food (e.g. açaí or sugar cane juice) contaminated by *T. cruzi* infected triatomines (Coura & Borges-Pereira, 2012), which has been responsible for outbreaks in some spots other than the Amazon (e.g. Santa Catarina State; Steindel et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +55 1633016943.

E-mail address: rosaja@fcfar.unesp.br (J.A. da Rosa).

In February 2012, the municipal health surveillance office of Monte Alto City, São Paulo State, Brazil, was notified by the local population of dwellings invaded at night by insects, supposed Chagas disease vectors. These notifications came from the urban center, more specifically from the 14th floor of a building located in front of a small wooded park (~11,500 m²) in the central square of the city. Therefore, a task force involving (i) the city health surveillance service, (ii) the city hall and (iii) the local superintendence of endemic diseases (SUCEN) made it possible to carry out an investigation of the palms in the central square.

Monte Alto city (21° 10' 34" S, 48° 33' W) is located 374 km from the capital of the state of São Paulo and has 46,642 inhabitants within an area of 347 km² (IBGE, 2012). The annual rainfall rate is 1441 mm (Agritempo, 2012) and the annual average temperature is 21.5 °C (Prefeitura Municipal de Monte Alto, 2012). There have not been any triatomine reports in human dwellings since 2003 (Wanderley et al., 2007). Therefore, since the local population as well as vector and medical surveillance systems are no longer used to dealing with Chagas disease and its vectors, the initial search was performed superficially, characterized by an extreme care to avoid any damage to the palm trees (e.g. pulling off or tearing live leaves). Therefore, this inspection was restricted to dead palm leaves, bird nests and vegetation residue. Unfortunately, it was impossible to carefully investigate the crowns of the palms due to difficult access. As a result, 174 palm trees of 10 species were investigated: *Caryota urens*, *Coccothrinax barbadensis*, *Dypsis lutescens*, *Dypsis madagascariensis*, *Livistona australis*, *Livistona chinensis*, *Phoenix roebelenii*, *Syagrus romanzoffiana*, *Roystonea oleracea* and *Roystonea regia*. The searching labor took three working days (a total of ~24 h). Five men, shared the task: one man climbed a mechanized mobile ladder to remove dead leaves, bird nests and vegetation debris while the others searched for bugs in everything that fell to the ground.

Of all the palms trees present in the square, only the three *L. australis* (Fig. 1) were positive for triatomines with this methodology, providing the 72 collected bugs (25 males, 22 females, 13 fourth stage and 12 fifth stage nymphs), all of which were identified as *R. neglectus*, according to Lent and Wygodzinsky (1979). It was impossible to determine how many bugs came from each tree because leaves and organic debris got mixed after falling down. However, live insects were surely seen in all of these three trees during the inspection. The distances between the infested palms and the invaded building were measured, as well as those from the palms to the closest residual forests, which shall be investigated regarding the presence of triatomines (Figs. 2 and 3).

An important feature of *L. australis* is that its leaves remain attached to the trunk for a long time, even after dying and drying, which favors the maintenance of bird nests and organic debris. This was the first record of *R. neglectus* associated with *L. australis* palms. Hitherto, *R. neglectus* had been only found in palms of the genera *Mauritia* spp. and *Acrocomia* spp. (Abad-Franch et al., 2009; Dias, 2000; Gurgel-Gonçalves and Cuba, 2007; Batista and Gurgel-Gonçalves, 2009). In Ceará State, Lima et al. (2008) established for the first time an unusual association between *R. nasutus* and the *Licania rigida* (Oiticica) tree, a large leafy tree of the Chrysobalanaceae family. Valença-Barbosa et al., in press reported also for the first time *Triatoma brasiliensis* colonizing cacti. *R. nasutus* usually inhabits palm trees, specially *Copernicia prunifera*, whereas *T. brasiliensis* had been considered exclusive for rocky outcrops. Almeida et al. (2009) claimed that this behavior alterations might be a result of man's environmental interference and has been increasingly evident for many triatomine species. This might be a synanthropization process, such as *T. sherlocki*, a species previously considered exclusively sylvatic, however recently detected colonizing homes in a quarry mining community. This event might be also applied to the novel occurrence of *R. neglectus* in *L. australis* in a very urbanized area.



Fig. 1. *Livistona australis* specimens from which *R. neglectus* specimens were collected.

Professionals from SUCEN, Ribeirão Preto (SP) staff, examined the insects by abdominal compression, followed by light microscopy in order to verify the natural infection by *T. cruzi*, but all specimens proved negative for the protozoan. However, most of the insects were with poor gut contents, which compromises a reliable parasite detection. Furthermore, molecular methods are required to assure the natural infection, because some insects may present a low parasitic burden (Ramsey et al., 2012). In addition, bugs collected might have been negative because they were all encountered in proximity to bird nests, birds being refractory to *T. cruzi* infection. However, bats (Chiroptera: Mammalia) inhabit the crown of the trees (A. Vedoveli, municipal department of epidemiological surveillance; personal communication, September 10, 2013), and opossums (Mammalia: Didelphimorphia), the most common *T. cruzi* synanthropic reservoir, are naturally abundant in urban areas, especially parks.

An inspection in the crown of the trees is still required, and we suspect that only a portion of the triatomine population was caught, as those supposed to be in the central crown of the trees evaded this capture effort. We consider the possibility that the crowns of other palm tree species are also infested. To answer this question, live-bait adhesive traps adapted for triatomine capture (for details, see: Noireau et al., 1999; Abad-Franch et al., 2000) will be applied for all palm trees in the area. Lima et al. (2008) collected an average of 3.9 triatomines per infested palm with this kind of trap in Ceará State.

Some Monte Alto neighboring cities (e.g. Araçatuba e Birigui) have already presented records of *R. neglectus* forming domiciliary colonies. Of special interest, a *R. neglectus* colony was discovered on the 10th floor of an apartment building in Araçatuba, where 20 first and second stage nymphs were captured (the precise date was



Fig. 2. Aerial picture of Monte Alto city taken by Google Earth, accessed on October 8, 2012. Distances from the infested palms 1 and 2 (PL1 and PL2) and the building invaded (B) by triatomines: PL1 – B: 83.70 m; PL2 – B: 50.94 m.



Fig. 3. Aerial picture of Monte Alto city taken by Google Earth, accessed on October 8, 2012. Distances from palms (PL) and the closest residual forests (F1, F2 and F3): PL1 – F1: 429.00 m; PL1 – F2: 464.00 m; PL1 – F3: 1146.00 m. For PL1 and PL2 definition, go to Figure 2.

not available; Rodrigues et al., 2009). Given that the epidemiological scenario is not static, the fact that *R. neglectus* specimens were present in an urban center from Monte Alto city is, per se, a reason for concern (Costa et al., 2002; López-Cárdenas et al., 2005; Rodriguero and Gorla, 2004). Micro-foci of Chagas disease have been attributed to either residential triatomine invasions or food contamination, incriminating several species of native triatomines, which may result in sporadic transmissions or even outbreaks (Abad-Franch et al., 2013).

As stressed above, the lack of natural infection for this capture technique does not mean there are no infected bugs in this area. The last national serological survey for Chagas disease, performed from 2001 to 2008 (Ostermayer et al., 2011), declared that there was no acute Chagasic case in children under five years old (V.M. Costa, Brazilian Department of Epidemiological Surveillance; personal communication, September 09, 2013) in the entire São Paulo State. However an element of the epidemiological channel (the vector in this case) arrives in a non-endemic place, an unprepared population is vulnerable at several levels: (i) to recognize the vector, (ii) to diagnose acute cases of the disease, (iii) to apply basic control measures and (iv) to prevent the dissemination of this new hazard. A future project will involve vector search/surveillance, health education and collection as well as handling of wild mammals

with the participation of specialized staff (mammalogists, medical veterinarians and doctors). Therefore, this finding warrants multidisciplinary research efforts in this area to evaluate this potential emerging public health issue.

Financial Support

CAPES (AUXPE – Parasitologia – 1528/2011, process number 23038.005285/2011-12) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (process numbers 2010/50.355-1, 2010/17027-0 and 2011/22378-0 – Fapesp).

Acknowledgments

We thank the anonymous reviewer for the helpful suggestions, technicians of Secretaria de Saúde de Monte Alto for essential help in the field, João Carlos Geraldo for palm trees identification, Café com Pernas Agency for figure improvement and English review and revision by Mitchell Raymond Lishon, native of Chicago, Illinois, U.S.A.–U.C.L.A. 1969.

References

- Abad-Franch, F., Noireau, F., Paucar, A.C., Aguilar, V.H.M., Carpio, C.C., 2000. The use of live-bait traps for the study of sylvatic *Rhodnius* populations (Hemiptera: Reduviidae) in palm trees. In: Papers in Entomology. Paper 129, <http://digitalcommons.unl.edu/entomologypapers/129>
- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Jaramillo, N.O., Gurgel-Gonçalves, R., Dias, F.B.S., Diotaiuti, L., 2009. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica* 112, 159–177.
- Abad-Franch, F., Diotaiuti, L., Gurgel-Gonçalves, R., Gürtler, R.E., 2013. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108 (2), 251–254.
- Agritempo [database on the Internet]. Sistema de monitoramento Agrometeorológico 2006 [cited 2012 April 14]. Available from: <http://www.agritempo.gov.br/modules.php?name=Mapas&estado=SP&ini1=0&ini2=&mapa=SP.ESTC.GIF&op=viewmaps>
- Almeida, C.E., Folly-Ramos, E.F., Peterson, A.T., Lima-Neiva, V., Gumiel, M., Duarte, R., Locks, M., Beltrão, M., Lima, M.M., Costa, J., 2009. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? *Vet. Med. Entomol.* 23, 410–417.
- Batista, T.A., Gurgel-Gonçalves, R., 2009. Ecological niche modelling and differentiation between *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, and *R. nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), in Brazil. *Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 1165–1170.
- Costa, J., Peterson, A.T., Beard, C.B., 2002. Ecological Niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 516–567.
- Coura, J.R., Borges-Pereira, J., 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 286–296.
- Dias, J.C.P., 2000. Epidemiologia. In: Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Neto, M. (Eds.), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas 2ª*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 431.
- Gurgel-Gonçalves, R., Cuba, C.A.C., 2007. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 24, 157–163.
- IBGE, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=353130> (Acesso: 14.04.06).
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Amer. Mus. Natur. Hist.* 163, 123–520.
- Lima, M.M., Sarquis, O., Oliveira, T.G., Gomes, T.F., Coutinho, C., Daflon-Teixeira, N.F., Toma, H.K., Britto, C., Teixeira, B.R., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., 2012. Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 143–149.
- Lima, M.M., Coutinho, C.F.S., Gomes, T.F., Oliveira, T.G., Duarte, R., Boia, M.N., Pereira, J.B., Sarquis, O., 2008. The risk presented by *Copernicia prunifera* palm trees in the *Rhodnius nasutus* distribution in a Chagas disease endemic area of the Brazilian northeast. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 750–754.
- López-Cárdenas, J., González-Bravo, F.E., Salazar-Schettino, P.M., Gallaga-Solórzano, J.C., Ramírez-Barba, E., Martínez-Méndez, J., Sánchez-Cordero, V., Townsend-Peterson Ramsey, J.M., 2005. Fine-scale predictions of distribution of Chagas disease vectors in the state of Guanajuato, Mexico. *J. Med. Entomol.* 42, 1068–1081.
- Noireau, F., Flores, R., Vargas, F., 1999. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 13–14.
- Ostermayer, A.L., Passos, A.D.C., Silveira, A.C., Ferreira, A.W., Macedo, V., 2011. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001–2008). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 108–121.
- Prefeitura Municipal De Monte Alto [database on the Internet]. Cidade – Dados Geográficos c2012 [cited 2012 April 14]. Available from: <http://www.montealto.sp.gov.br>
- Ramsey, J.M., Gutiérrez-Cabrera, A.E., Salgado-Ramírez, L., Peterson, A.T., Sánchez-Cordero, V., Ibarra-Cerdeña, C.N., 2012. Ecological connectivity of *Trypanosoma cruzi* reservoirs and *Triatoma pallidipennis* hosts in an anthropogenic landscape with endemic Chagas disease. *PLoS ONE* 7, 46013.
- Rodriguero, M.S., Gorla, D., 2004. Latitudinal gradient in species richness of the New World Triatominae (Reduviidae). *Global Ecol. Biogeogr.* 13, 75–84.
- Rodrigues, V.L.C.C., Silva, R.A., Wanderley, D.M.V., Carvalho, M.E., Junior, C.P., 2009. Detecção de triatomíneos da espécie *Rhodnius neglectus* em área urbana de municípios da região de Araçatuba. *Bol. Epidemiol. Paul.* 6, 63.
- Schofield, C.J., Galvão, C.J., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110, 88–100.
- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., Moraes, M.H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T.C., Stoco, P.H., Murta, S.M., Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E.C., 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 25–32.
- Valença-Barbosa, C., Lima, M.M., Sarquis, O., Abad Franch, F.A., 2013. Common Caatinga Cactus, *Pilosocereum gounellei*, Is an Important Ecotope of Wild *Triatoma brasiliensis* populations in the Jaguaribe valley of Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, in press.
- Wanderley, D.M.V., Silva, R.A., Carvalho, M.A., Barbosa, G.L., 2007. Doença de Chagas: a vigilância entomológica no Estado de São Paulo Chagas disease: entomological surveillance in the State of São Paulo. *Bol. Epidemiol. Paul.* 4, 38.
- WHO, 2010. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Cited: 18 March 2013.

Evolutionary Relationships of the *Triatoma matogrossensis* Subcomplex, the Endemic *Triatoma* in Central-Western Brazil, Based on Mitochondrial DNA Sequences

Sueli Gardim, Cláudia S. Rocha, Carlos E. Almeida, Daniela M. Takiya, Marco T. A. da Silva, Daniela L. Ambrósio, Regina M. B. Cicarelli, and João A. da Rosa*

Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil; Department of Zoology, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo (USP), São Carlos, Brazil; Department of Genetics and Developmental Biology, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut

Abstract. The phylogenetic relationships among species of *Triatoma matogrossensis* subcomplex (*T. baratai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. sordida*, *T. vanda*, and *T. williami*) was addressed by using fragments of cytochrome oxidase I (COI), 16S rDNA (16S), and cytochrome *b* (Cytb) through Bayesian and parsimony analyses. We did not recover a monophyletic *T. matogrossensis* subcomplex, and their members were found clustered in three strongly supported clades, as follows: i) *T. jurbergi* + *T. matogrossensis* + *T. vanda* + *T. garciabesi* + *T. sordida*; ii) with *T. guasayana* as the sister group of clade (i); and iii) *T. williami* + *T. guazu*, however not closely related to the clade formed by the previously mentioned species. The other two endemic species from Central-Western Brazil, *T. baratai* and *T. costalimai*, were not recovered with strong clade support as related to other members of this subcomplex. Results call for a further revision in the classification of the subcomplexes within the genus *Triatoma*.

INTRODUCTION

Carlos Chagas¹ described *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of American trypanosomiasis, in 1909 and noted that this protozoan was transmitted by triatomines. After the first reported human cases of the disease, studies on the vector species reservoirs and description of new triatominae species started to increase. Galvão and others² included 19 genera and 137 species into the subfamily Triatominae, but currently it consists of 145 valid species belonging to 18 genera, of which 65 species occur in Brazil.^{3–11}

Some *Triatoma* species are grouped into complexes, and subcomplexes based on morphological similarities, geographical distribution, epidemiological importance, phylogenetic relationships, and others. At the moment, there is no consensus about the features that define complexes.^{11–14} Thirteen *Triatoma* species have been found in Central-Western Brazil, but only seven are considered endemic: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deanorum*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*, and *T. williami*.^{2,13,15,16} Based on morphological similarities, Carcavallo and others,¹⁷ grouped these species into the *T. oliveirai* complex together with *T. klugi* and *T. oliveirai*, which are found in Southern Brazil. We must stress that *T. oliveirai*, *T. baratai*, and *T. deanorum* are rare species, difficult to collect¹⁸; and for this reason studies about them are scarce on all grounds. The epidemiological importance related to Chagas disease vectors is continually changing. *Triatoma sherlocki*, for example, was described in 2002 as a sylvatic species,¹⁹ and was recently found invading and colonizing human domiciles in Bahia State^{20,21}; it highlights the importance of understanding the phylogenetic relationships of sylvatic species. Several other species can be mentioned in this context.¹⁴

The latest classification scheme, proposed by Schofield and Galvão,¹³ summarizing results from different analyses, placed

members previously considered belonging to the *T. oliveirai* complex into two subcomplexes (within the *T. infestans* complex): i) *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*, and *T. williami*, forming the *T. matogrossensis* subcomplex; and ii) *T. oliveirai* and *T. klugi*, included in the *T. rubrovaria* subcomplex, along with four other species from the Southern region of Brazil: *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. limai*, and *T. rubrovaria*. Of additional interest to this work, *Triatoma sordida* was placed in the *T. sordida* subcomplex, which included *T. garciabesi*, *T. guasayana*, and *T. patagonica*.

Triatominae species that overlap in geographic distribution are sometimes subjected to the same ecological pressures, and it remains a question whether the evident morphological similarities among them are a result of ecological convergences or of their phylogenetic relationships. On the other hand, distinct ecological forces might also promote morphological differentiation among sympatric phylogenetically related species.²² In sylvatic species, for which samples are difficult to be obtained, species complex definition has been chiefly based on morphological and ecological features; and for this reason, cytochrome *b* (Cytb), cytochrome oxidase I (COI), and 16S rDNA (16S) sequences of mitochondrial DNA were used to evaluate the phylogenetic relationships among seven *Triatoma* species occurring in Central-Western Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Multiple specimens of seven sylvatic species of *Triatoma* were used for gene sequencing: *T. baratai* ($N = 4$), *T. costalimai* ($N = 6$), *T. guazu* ($N = 6$), *T. matogrossensis* ($N = 5$), *T. vanda* ($N = 4$), *T. williami* ($N = 6$), and *T. sordida* ($N = 5$) (Table 1, Figure 1). Except for *T. sordida*, all of the previously mentioned species belong to the *T. matogrossensis* subcomplex. However, *T. sordida* was included in the analysis because of its epidemiological importance and because some studies have shown this species as related to *T. matogrossensis*.^{12,23,24} According to Forattini²⁵ and Galvão and others,² Central-Western Brazil is the center of dispersion of these seven species. The specimens studied

*Address correspondence to João A. da Rosa, Rod. Araraquara-Jaú, Km 1, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Parasitologia, CEP 14801-902 Araraquara/SP, Brazil. E-mail: rosaja@cfar.unesp.br

TABLE 1
Colony number (CTA - from the Triatominae Insectarium, São Paulo State University), origin and start date of colonies studied

Species	Colony number	Initiated	Origin	Coordinates
<i>Triatoma baratai</i>	CTA 247	08/2007	Nioaque, Mato Grosso do Sul (MS)	55.83°W 21.13°S
<i>Triatoma costalimai</i>	CTA 191	03/1996	Mambaí, Goiás (GO)	46.11°W 14.48°S
<i>Triatoma guazu</i>	CTA 232	07/2001	Barra do Garça, Mato Grosso (MT)	52.25°W 15.89°S
<i>Triatoma matogrossensis</i>	CTA 248	05/2007	Rio Verde de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (MS)	54.84°W 18.91°S
<i>Triatoma sordida</i>	CTA 028	08/1982	Brasilândia, Mato Grosso do Sul (MS)	52.03°W 21.25°S
<i>Triatoma vanda</i>	CTA 231	07/2001	Itiquira, Mato Grosso (MT)	54.15°W 17.20°S
<i>Triatoma williami</i>	CTA 184	12/1995	Barra do Garça, Mato Grosso (MT)	52.25°W 15.89°S

were randomly obtained from colonies maintained at the Triatominae Insectarium of the Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (Araraquara, Brazil). Because sequences of the mitochondrial genes studied herein of *T. vanda* and *T. baratai* were obtained for the first time, representative species of other groups of Latin America triatomines, such as the *T. brasiliensis* species complex and *T. rubrovaria* subcomplex, were also included for comparison.

The origin of the colonies of *T. matogrossensis* subcomplex maintained at the insectarium and their published distributional records were used in the construction of a map of the known geographic distribution (Figure 2).^{2,12,13,16-18,23-32} In Brazil, *T. sordida* overlaps the geographic distribution of all species herein studied (also occurring in the states of Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and São Paulo). This species is also found in the Chaco eco-region of other countries: Argentina, Bolivia, Paraguay, and Uruguay.^{2,25,33} Regarding the members of *T. matogrossensis* subcomplex, only *T. deaneorum* has not been included in this phylogenetic study because of its rarity, which has been also addressed by others authors.¹⁸

Genomic DNA extraction was performed according to the protocol described by Sambrook and Russell.³⁴ From the

extracted DNA, 16S and COI fragments were amplified as described by Sainz and others,²³ and for Cytb as by Lyman and others,³⁵ and purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Purified products were subjected to a sequencing reaction using BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and were analyzed in the ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Additional sequences of Cytb and 16S and COI deposited at GenBank were added to the analysis. *Rhodnius prolixus* was used as an outgroup (Table 2).^{12,20,23,24,35-43}

Sequences were edited with BioEdit 7.0.5 and aligned with ClustalW.⁴⁴ Nucleotide data for Cytb and COI were transformed into amino acid sequences to check the alignment. Separate and combined phylogenetic analyses of 16S, Cytb, and COI sequences were run under a Bayesian framework in MrBayes 3.1 (2 independent runs, 4 chains, and 1 M gens)⁴⁵ and the maximum parsimony criterion in PAUP (*hsearch*, 1,000 random addition replicates with TBR branch swap, gaps treated as “?”).⁴⁶ The following evolutionary models were chosen for the three partitions in the mixed-model Bayesian analysis using the Akaike information criterion in MrModeltest^{47,48}: HKY+I+G for 16S rDNA; HKY+I+G for Cytb; for COI was used GTR+I+G. Clade support was estimated by Bayesian posterior probabilities

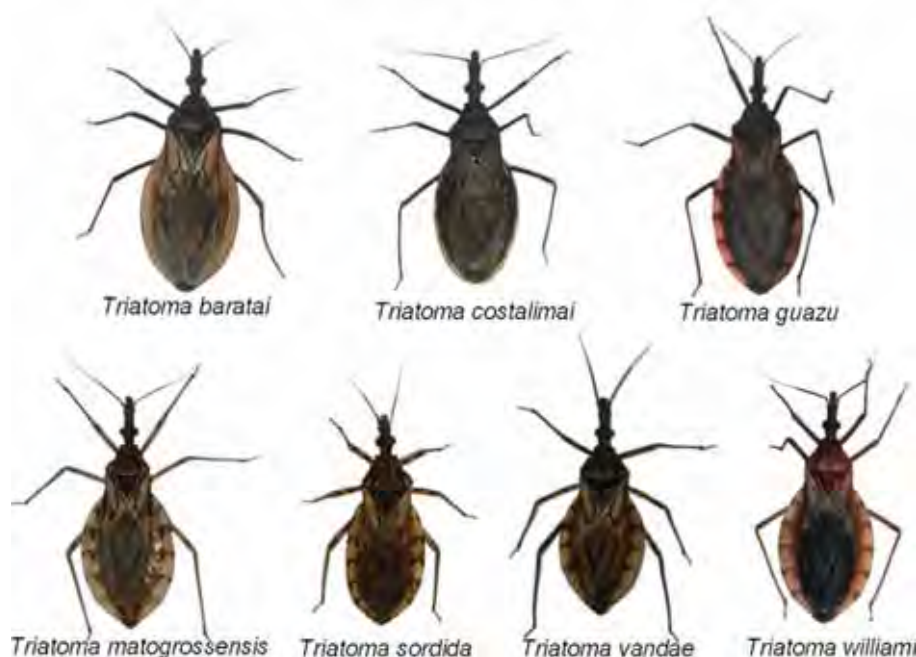


FIGURE 1. Dorsal view of specimens from the colonies studied: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. sordida*, *T. vanda*, and *T. williami*. Pictures of Sueli Gardim.

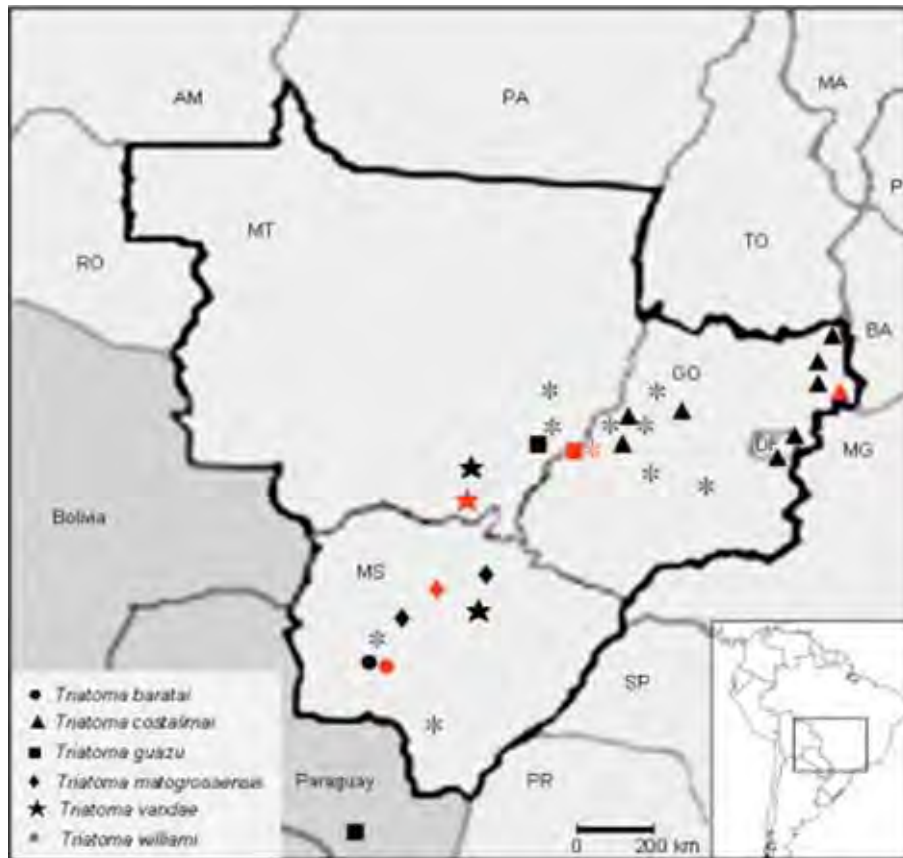


FIGURE 2. The known geographic distribution of species of the *T. matogrossensis* subcomplex in the Central-Western Region of Brazil.^{2,13–16,22–28} In red spots where the specimens herein studied originated. For details, see Table 1. The geographic distribution of *T. sordida* overlaps all spots for the members of *T. matogrossensis* subcomplex, and the Chaco eco-region of Argentina, Bolivia, Paraguay, and Uruguay.^{2,25,33}

TABLE 2
Accession codes from GeneBank sequences of *Triatoma* and outgroup species used in this study

Subcomplex	Species	16S	Cytb	COI
<i>T. brasiliensis</i>	<i>T. brasiliensis</i>	EU827222	AY336524	AF021186
	<i>T. juazeirensis</i> (haplotype F)	–	AY494168	–
	<i>T. melanica</i> (haplotype H)	–	AY336527	–
	<i>T. sherlocki</i>	EU489057	EU489058	KC608987
<i>T. infestans</i>	<i>T. infestans</i>	EU143699	AY702023	AF021199
	<i>T. maculata</i>	EU827231	KC608977	AF449139
<i>T. matogrossensis</i>	<i>T. pseudomaculata</i>	EU827225	KC608979	KC608986
	<i>T. baratai</i>	KC571991	KC608974	–
<i>T. rubrovaria</i>	<i>T. costalimai</i>	KC571993	KC608975	KC608983
	<i>T. guazu</i>	KC571994	KC608976	KC608984
	<i>T. jurbergi</i>	AY035456	–	–
	<i>T. matogrossensis</i>	KC571995	KC608978	KC608985
	<i>T. vandeae</i>	KC571997	–	KC608989
	<i>T. williamsi</i>	KC571998	KC608981	KC608990
	<i>T. carcavalloii</i>	KC571992	–	KC608982
	<i>T. circummaculata</i>	AF021188	–	AF021191
<i>T. sordida</i>	<i>T. klugi</i>	AY035463	*	–
	<i>T. rubrovaria</i>	AF021203	GQ398003*	AF021204
	<i>T. garciabesi</i>	AY185835	–	–
	<i>T. guasayana</i>	AF021194	*	AF021193
	<i>T. patagonica</i>	AY035464	–	–
outgroup	<i>T. sordida</i>	KC571996	KC608980	KC608988
	<i>P. megistus</i>	AF045701	AF045722	AF021179
	<i>R. prolixus</i>	AF045707	EF011726	AF449138

(Rocha and others, 2009, unpublished data with asterisks).^{20,23–43} Sequences obtained in this study are in bold.
(–) Not available.

(BPP) and 1,000 pseudoreplicates of non-parametric parsimony bootstrap (PB).

RESULTS

Twenty-five new sequences were obtained (8 for 16S, 8 for Cytb, and 9 for COI; Table 2). These sequences were aligned with other sequences available at GenBank and cropped according to the shorter sequences. The alignment constructed for the phylogenetic analysis included 256 basepairs (bp) of 16S (83 variable sites, including 70 parsimony informative), 313 bp of Cytb (109 variable sites, including 84 parsimony informative), and 202 bp of COI (75 variable sites, including 58 parsimony informative), totaling 771 bp evaluated.

For the *Triatoma* species a single haplotype for each gene was found, except for two Cytb haplotypes for *T. matogrossensis* and *T. baratai*, and three haplotypes of Cytb for *T. guazu*. In cases of two haplotypes, *p*-distances (all < 0.6%) were within the expected for intraspecific variation and after pilot phylogenetic reconstructions, they were always clustered together. Therefore, a single haplotype was chosen as representative. Two of the sequenced Cytb haplotypes of *T. guazu* showed stop codons, and most probably represent pseudogenes, therefore were excluded from the analysis (see discussion below). *Triatoma costalimai* showed a large deletion of position 182 to 220 of Cytb sequence referring to a string of 13 amino acids. If this fragment is the homologous mitochondrial copy, apparently this deletion is not deleterious because it was confirmed in six adult specimens. However, because of the absence of stop codons, this sequence was maintained in the analysis, although there is a possibility it might be a pseudogene like as in *T. guazu*.

Interestingly, finding intraspecific variation in only these three species is consistent with the date of the start of the colony. These younger colonies have been maintained from 5 to 11 years, whereas most other species have been maintained from 15 to 30 years and are possibly highly inbred. *Triatoma baratai* and *T. vanda* did not have any sequences of 16S deposited in GenBank, and also *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*, and *T. williami* of Cytb.

Interspecific pairwise divergence (uncorrected *p*-distances) within *Triatoma* herein focused varied in 16S sequences from 0.4% (between *T. pseudomaculata*-*T. maculata*) to 8.7% (*T. garciabesi*-*T. brasiliensis* and *T. sordida*-*T. infestans*), in Cytb sequences from 0.7% (*T. pseudomaculata*-*T. maculata*) to 21.3% (*T. sordida*-*T. sherlocki*), and in COI sequences from 1.5% (*T. williami*-*T. guazu*) to 22.9% (*T. sordida*-*T. infestans*) (Supplemental files).

Figure 3 shows the contribution of each gene for the phylogenetic reconstruction of members of *T. matogrossensis* subcomplex. In the analysis of 16S (Figure 3A), a clade including *T. jurbergi*, *T. vanda*, *T. sordida*, *T. garciabesi*, and *T. matogrossensis* was recovered with high support (PB = 97% and BPP = 99%). However, for this gene, *T. guasayana* was not included in this group, being placed in *T. rubrovaria* subcomplex. The analysis of COI (Figure 3C) gene by itself recovered *T. sordida* and *T. matogrossensis* as closely related (PB = 91% and BPP = 81%), a relationship also recovered by the Cytb analysis (Figure 3B), but in this case, *T. sordida* is found to be sister to *T. guasayana* + *T. matogrossensis* (PB = 98% and BPP = 100%). Except for

the analyses based on the 16S gene, all others recovered *T. williami* and *T. guazu* as sister species with high clade support (All PB ≥ 95% and BPP ≥ 99%; Figures 3B and C and Figure 4).

Both Bayesian and parsimony analyses resulted in a similar topology (Figure 4) for the analyses of the combined genes, with a markedly higher branch support for certain clades, as compared with separate analyses (Figure 3). Focusing on the Central-Western species, three strongly supported clades were recovered as follows: i) one including the species *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*, *T. garciabesi*, and *T. sordida* (PB = 83% and BPP = 100%); ii) one with *T. guasayana* as sister to this previously mentioned clade (PB = 59% and BPP = 100%); and iii) another with *T. williami* + *T. guazu* (PB = 99% and BPP = 100%). Based on the results of the combined analysis presented herein, it is not possible to say whether clade (iii) is related to the other previously mentioned Central-Western species. However, *T. williami* and *T. guazu* were recovered (without strong support) as related to each other and, also to the remaining Central-Western species, *T. baratai* and *T. costalimai*, in both 16S and Cytb separate analyses.

According to our results, the *T. matogrossensis* subcomplex as currently defined by Schofield and Galvão¹³ was not found to be a monophyletic unit, because other species, currently placed in the *T. sordida* subcomplex, including one of the main Chagas disease vectors in Brazil, *T. sordida*, were recovered as strongly related to some species from this group, especially *T. matogrossensis*, *T. jurbergi*, and *T. vanda*.

DISCUSSION

Traditionally, the phylogeny of newly described or strictly sylvatic triatomine species has been inferred based on morphological comparisons.^{16,49,50} In this study, the phylogenetic relationships among *Triatoma* species (*T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. sordida*, *T. vanda*, and *T. williami*) occurring in Central-Western Brazil were analyzed using molecular information (mtDNA fragments of 16S ribosomal RNA, Cytb, and COI) through Bayesian and parsimony analysis. Both analyses provided satisfactory information for species, which had never been studied, addressing the phylogenetic reconstruction of these groups of triatomines found in Central-Western Brazil. Overall, not a single gene was particularly great in recovering these relationships, showing low clade support in most clades, however the combined analysis showed higher clade support for the clades of interest.

The use of insects from colonies for several kinds of approaches remains controversial because of genetic drift and loss of genetic variability⁵¹; an interesting observation of this study is the apparent homogeneity of mtDNA from bugs maintained in colonies for several generations. Garcia and Powell³⁶ sequenced 16S (AF021212) and COI (AF021213) from *T. sordida* from the same colony used herein when it was 14 years old. In this study, 16 years later, the same haplotypes obtained by these authors were also found for both genes. Considering that no selective pressure appears to be affecting and driving mtDNA variation, we concluded that mtDNA is a suitable source of information for exploring phylogenetic relationships, even

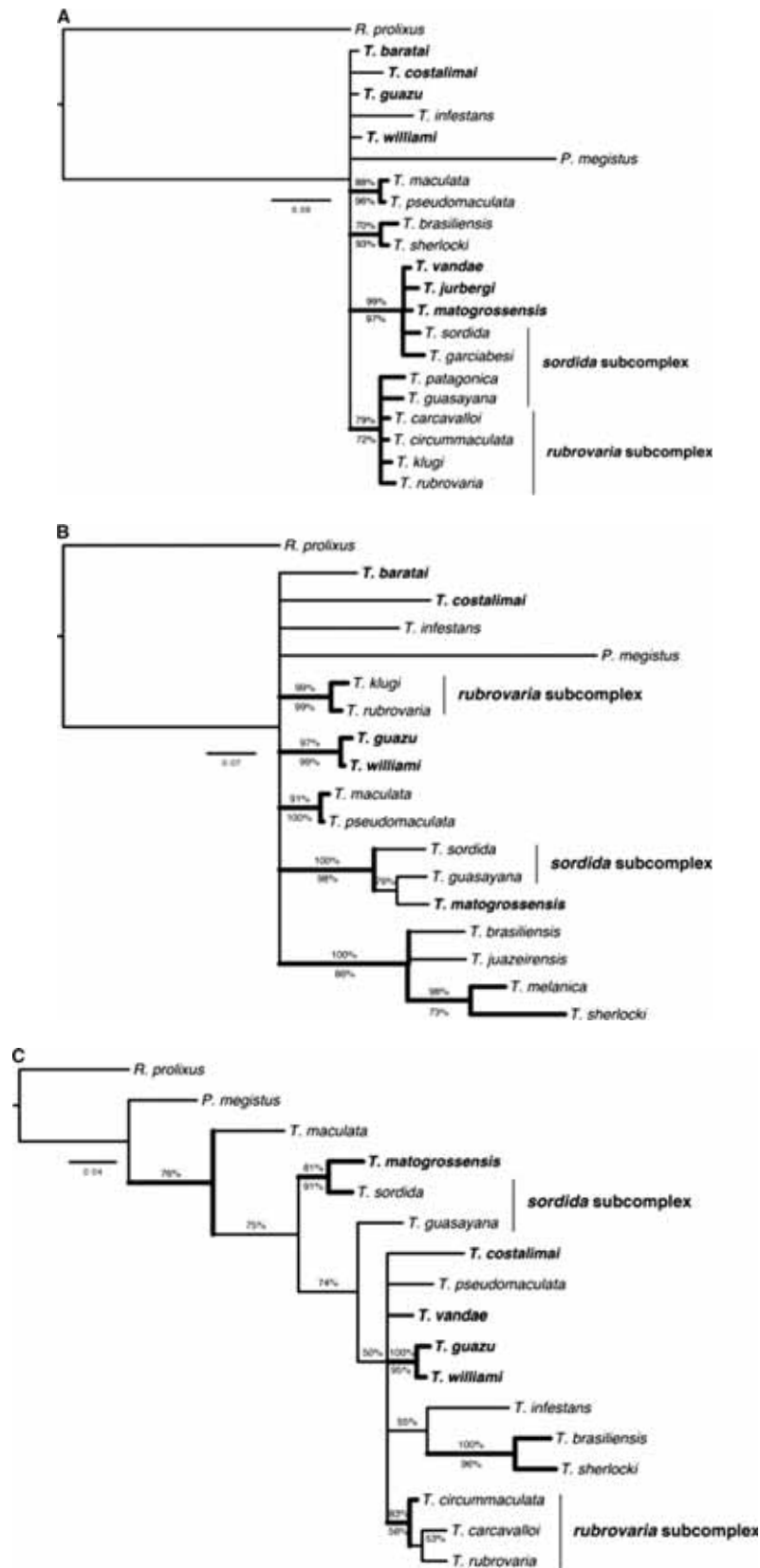


FIGURE 3. Bayesian inference consensus for each molecular marker of *Triatoma* species: (A) 16S (HKY+I+G), (B) Cytb (HKY+I+G), and (C) COI (GTR+I+G). Thick clades represent those also recovered by parsimony. Percentages above the nodes indicate Bayesian posterior probabilities (BPP), whereas those below indicate parsimony bootstrap percentages (PB). Taxa in bold are current members of the *T. matogrossensis* subcomplex.

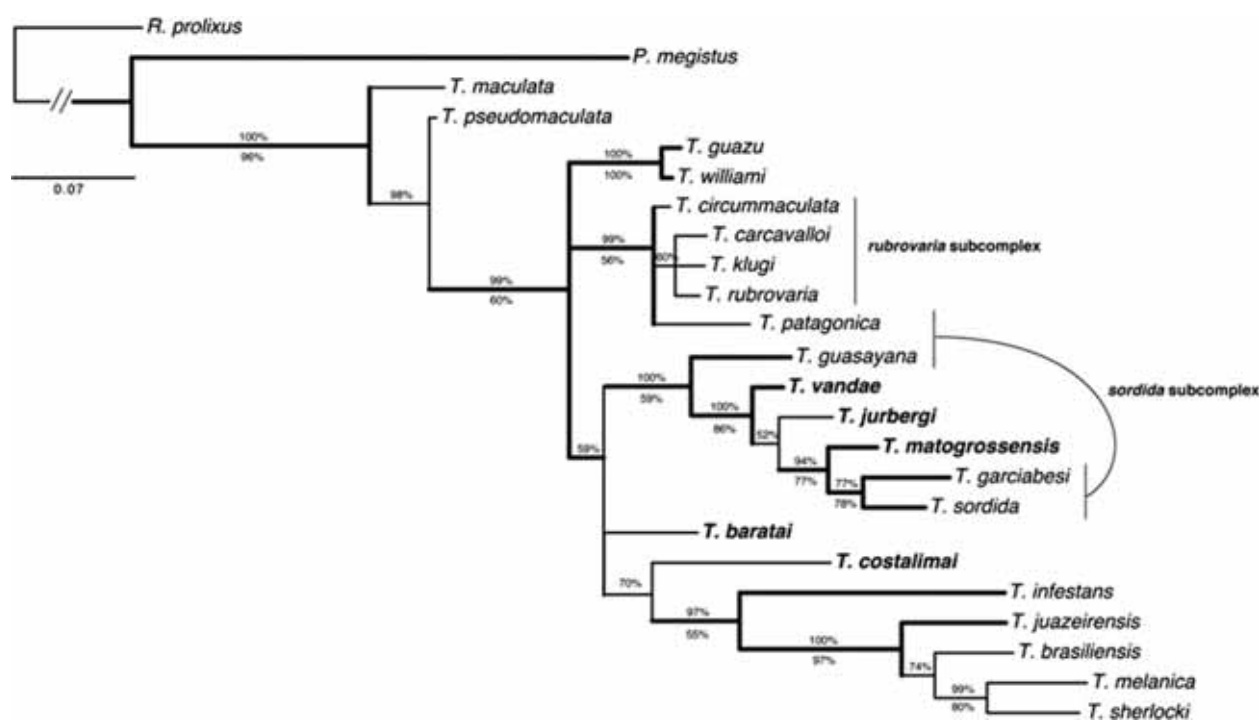


FIGURE 4. Bayesian inference consensus of the combined analysis of sequences of *Triatoma* species occurring in Central-Western Brazil. Molecular evolution models for each partition were HKY+I+G for 16S, GTR+I+G for COI, and HKY+I+G for Cytb. Thick clades represent those also recovered by parsimony. Percentages above the nodes indicate Bayesian posterior probabilities (BPP), whereas those below indicate parsimony bootstrap percentages (PB). Taxa in bold are current members of the *T. matogrossensis* subcomplex.

when obtained from individuals maintained in laboratory conditions over decades.

Sequences of 16S were overall more informative for the combined analysis between species, whereas Cytb and COI were possibly more useful for recovering relationships among more closely related species, because of its faster rate of evolution (in average 3.3 times faster), which can be observed by comparing the pairwise divergences.

Aside from the poor resolution obtained by the combined analyses, at least for separate analyses of the molecular markers, this study does not recover a strict monophyletic group for the seven aforementioned species placed in the *T. matogrossensis* subcomplex, mostly because members of the *T. sordida* subcomplex, such as *T. guasayana*, *T. garciabesi*, and *T. sordida*, tend to be recovered as related to them. This proximity found among members of the *T. sordida* subcomplex to members of the *T. matogrossensis* subcomplex is in agreement with previously published analyses, although this was previously recovered only with 16S and 12S sequences.^{12,13,23,24} With the herein newly added Cytb and COI sequences of species belonging to the *T. matogrossensis* subcomplex, the need for a future revision for both *T. matogrossensis* and *T. sordida* subcomplexes to better define the limits of the current classification is reinforced.

The placement of *T. guasayana* in our analyses disagrees in part with previous published analyses. In none of the analyses conducted herein, *T. guasayana* was recovered as sister to *T. sordida*, which was expected because of isoenzyme electrophoresis genetic distances, morphological and ecological similarities, and overlapping distribution in northern Argentina and part of the Bolivian Chaco and Paraguay.⁵²

Furthermore, it also disagrees with Sainz and others,²³ Garcia and others,²⁴ and Almeida and others,⁵³ which reconstructed the phylogeny of selected *Triatoma* species based on fragments of the mtDNA genes: 12S + 16S + COI and placed this species as more related to members of the *T. rubrovaria* subcomplex. In fact, by using only 16S, *T. guasayana* was clustered with members of the *T. rubrovaria* subcomplex; however, by using the COI and Cytb, *T. guasayana* (both obtained in this study) was clustered with members of *T. sordida* and *T. matogrossensis* subcomplexes (Figure 3).

The position of *T. costalimai* was also incongruent in each of the separate analyses, but usually it was recovered as related to a member of the *T. matogrossensis* subcomplex. This is not a surprising result considering that Hypsa and others¹² based on a parsimony analysis of 16S sequences and Sainz and others²³ based on a parsimony analysis of 16S + 12S, found this species as the sister species to all other Central-Western Brazil species. A maximum likelihood reanalysis of Hypsa and others¹² data set by Schofield and Galvão,¹³ however placed this species at an even more distant position, relating it to a clade composed of members of some other subcomplexes like *T. brasiliensis*, *T. maculata*, and *T. rubrovaria*, in addition to *T. matogrossensis* and *T. sordida*.

The other two recovered clades of *Triatoma* from Central-Western Brazil actually corroborated morphometric and isoenzymatic phylogenetic analyses by Noireau and others¹⁶ focusing on the called "*T. oliveirai* complex" (actually *T. matogrossensis* subcomplex, according to Carcavallo and others⁵⁴ and Schofield and Galvão¹³). Both distance analyses of morphological measurements and 20 isoenzyme loci support a close relationship between *T. vandae* and *T. jurbergi*

as a sister clade of *T. matogrossensis*, whereas *T. guazu* and *T. williami* with a significant distance from *T. klugi*. These relationships are in complete agreement with the present analysis. In fact, *T. guazu* and *T. williami* showed only 1.2% sequence divergence of 16S, representing the lowest found herein, concerning the sylvatic species from Central-Western Brazil. The close phylogenetic relationship between these two species had already been addressed by Noireau and others¹⁶ and De Paula and others,⁵⁵ and was confirmed herein with high node support for the Bayesian analysis (BPP = 100). Low values of *p*-distances associated with an overlapping geographic distribution have also been found by Almeida and others⁵³ for species occurring in Southern Brazil, which might be a result of recent speciation events.

Triatoma sordida is currently one of the most important Chagas disease vectors in some states of Brazil (e.g., Minas Gerais).^{56,57} According to Forattini,²⁵ its dispersion center was the Central-Western Region of Brazil and it stands out from the others species because it is a predominant species in Mato Grosso do Sul, Goiás and other states in Brazil and it forms large colonies in human dwellings, especially in the peridomicile.^{58,59} This distribution was confirmed by Gurgel-Gonçalves and others.³³ The epidemiologic scenario related to new sylvatic vectors that have been invading and colonizing homes are continually increasing.^{14,53,60} Therefore, the close relationship between *T. sordida*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*, and *T. garciabesi* calls the attention for the epidemiologic potential of these species; as such *T. guasayana*, has already been found invading and colonizing homes.⁵²

Two of the Cytb sequences for *T. guazu* obtained, but not used in this analysis, most likely represent pseudogenes, possibly a nuclear copy (*numts*) that can be very common in insect genomes⁶¹ and not uncommon to amplify using direct polymerase chain reaction (PCR) methods.⁶² The assumption that the recovered sequences were paralogous copies, was a result of being impossible to properly align both haplotypes of Cytb to other sequences. When aligned based on nucleotide similarity, it required three indel events, two insertion events of a single nucleotide and a downstream deletion event of two nucleotides, and it shifted the open reading frame in the area between these events, resulting in stop codons being observed in all sequences. Previously, amplification of pseudogenes in Triatominae was reported for ND1, ND2, and COI⁶³ and is herein reported for Cytb. Considering that the density of *numts* in insect genomes is apparently lineage-specific and, as far as it is known, there is little information in Hemiptera,^{61,63} future sequencing by direct PCR of Cytb for phylogenetic reconstruction should be done with caution.

CONCLUSION

Considering species from Central-Western Brazil, which had some genes sequenced for the first time, *T. baratai* and *T. vanda* were analyzed phylogenetically based on DNA sequences. The analyses confirmed the relationship of both *T. vanda* and *T. baratai* as members of the *T. matogrossensis* subcomplex, however the monophyly of this subcomplex was not recovered because of the close relationship of some members to members of the *T. sordida* subcomplex. This added phylogenetic evidence calls for a re-evaluation of

the current classification of triatomines. This re-evaluation should be based on additional multiple molecular markers, especially nuclear genes, as mitochondrial protein-coding genes used so far are apparently too variable, and possibly saturated, to recover these relationships with strong support.

Received November 30, 2012. Accepted for publication May 20, 2013.

Published online September 3, 2013.

Note: Supplemental table appears at www.ajtmh.org.

Acknowledgments: We thank Dayse da Silva Rocha, José Jurberg, Ionizete Garcia da Silva, José Maria Soares Barata, Paulo Silva de Almeida, and Sebastião Aldo da Silva Valente for providing the first specimens that gave rise to the colonies of *Triatoma baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, and *T. vanda* used herein.

Financial support: Financial support includes grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process numbers 2010/50.355-1, 2010/17027-0, and 2011/22378-0 - Fapesp, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil).

Authors' addresses: Sueli Gardim and Cláudia S. Rocha, UNESP, Biological Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil, E-mails: sugardim@gmail.com and clausolanorocha@yahoo.com.br. Carlos E. Almeida and Regina M. B. Cicarelli, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Ciências Biológicas, Araraquara, São Paulo, Brazil, E-mails: almeida_ce@hotmail.com and cicarelli@cfar.unesp.br. Daniela M. Takiya, Federal University of Rio de Janeiro, Department of Zoology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, E-mail: takiya@gmail.com. Marco T. A. da Silva, University of São Paulo (USP), Physics Institute of São Carlos, São Carlos, São Carlos, Brazil, E-mail: tulio@ursa.ifsc.usp.br. Daniela L. Ambrósio, University of Connecticut Health Center, Department of Genetics and Developmental Biology, Farmington, CT, E-mail: dlambrosio@yahoo.com.br.

REFERENCES

- Chagas CR, 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen. n. esp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159–218.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J, 2003. 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.
- Poinar JR, 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a Triatomine-Trypanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 72–81.
- Costa J, Argolo AM, Felix M, 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva and Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47–52.
- Galvão C, Angulo VM, 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) form Santander, Colômbia. *Zootaxa* 1241: 61–68.
- Bérenger JM, Blanchet D, 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 733–736.
- Costa J, Felix M, 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87–90.
- Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Benigno V, Vidaurre P, 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolívia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Bol Inst Investig Salud y Desarrollo* 3: 1–10.
- Sandoval CM, Pabon E, Jurberg J, Galvão C, 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55–64.

10. Jurberg J, Rocha DS, Galvão C, 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton and Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9: 123–128.
11. Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MP, Mendonça VJ, Ferreira Filho JC, Carvalho EO, Camargo LM, Oliveira J, Nascimento JD, Cilense M, Almeida CE, 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* sp.n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62–76.
12. Hypsa V, Tietz D, Zrzavy J, Rego RO, Galvão C, Jurberg J, 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447–457.
13. Schofield CJ, Galvão C, 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88–100.
14. Costa J, Lorenzo M, 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 46–51.
15. Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman RE, 1966. The biosystematics of Triatominae. *Ann Rev Ent* 11: 309–330.
16. Lent H, Wygodzinsky P, 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123–520.
17. Carcavallo RU, Jurberg J, Rocha DS, Galvão C, Noireau F, Lent H, 2002. *Triatoma vandae* n. sp. do complexo *oliveirai* encontrada no Estado de Mato Grosso, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 649–654.
18. Noireau F, Santos SM, Gumiel M, Dujardin JP, Soares MS, Carcavallo RU, Galvão C, Jurberg J, 2002. Phylogenetic relationships within the *oliveirai* complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infect Genet Evol* 2: 1–17.
19. Papa AR, Jurberg J, Carcavallo RU, Cerqueira RL, Barata JM, 2002. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores* 9: 133–146.
20. Almeida CE, Folly-Ramos E, Peterson AT, Lima-Neiva V, Gumiel M, Duarte R, Lima MM, Locks M, Beltrão M, Costa J, 2009. Could *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? Medical and veterinary entomology. *Med Vet Entomol* 23: 410–417.
21. Almeida CE, Oliveira HL, Correia N, Dornak LL, Gumiel M, Neiva VL, Harry M, Mendonça VJ, Costa J, Galvão C, 2012. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Trop* 122: 71–79.
22. Futuyma DJ, 2009. *Evolution*. Second edition. Sunderland, MA: Palgrave Macmillan Sinauer Associates.
23. Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA, 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121: 229–240.
24. García BA, Moriyama EN, Powell JR, 2001. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. *J Med Entomol* 38: 675–683.
25. Forattini OP, 1980. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. *Rev Saude Publica* 14: 265–299.
26. Mello DA, Borges MM, 1981. Primeiro encontro do *Triatoma costalimai* naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo de aspectos biológicos da amostra isolada. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 61–69.
27. Mello DA, 1982. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saude Publica* 16: 282–291.
28. Lent H, Jurberg J, Galvão C, 1996. Descrição do alótipo (macho) de *Triatoma guazu* Lent, Wygodzinsky, 1979 proveniente do Estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 313–315.
29. Carcavallo RU, Galvão C, Lent H, 1998. *T. jurbergi* sp.n. do norte do Estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) com uma atualização das sinonímias e outros táxons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 459–464.
30. Carcavallo RU, Jurberg J, 2000. *T. baratai* sp.n. do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol. Vectores* 7: 373–387.
31. Oliveira AW, Silva IG, 2007. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 204–208.
32. Almeida PS, Ceretti-Júnior W, Obara MT, Santos HR, Barata JM, Faccenda O, 2008. Survey of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 374–380.
33. Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT, 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med*. doi:10.1155/2012/705326. Epub 2012 Feb 27.
34. Sambrook J, Russell DW, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
35. Lyman ED, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB, 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377–386.
36. Garcia BA, Powell JR, 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J Med Entomol* 35: 232–238.
37. Gaunt MW, Miles MA, 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol Biol Evol* 19: 748–761.
38. Giordano R, Cortez JCP, Paulk S, Stevens L, 2005. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 753–760.
39. Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J, 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32: 46–56.
40. Pavan MG, Monteiro FA, 2007. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health* 12: 751–758.
41. Ceretti-Junior W, Vendrami DP, Gil JM, Barata JM, Marrelli MT, 2008. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. *Rev Bras Entomol* 52: 455–462.
42. Mendonça VJ, Silva MT, Araujo RF, Junior JM, Junior MB, Almeida CE, Costa J, Graminha MA, Cicarelli RM, Rosa JA, 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am J Trop Med Hyg* 81: 858–864.
43. Segura EL, Torres AG, Fusco O, García BA, 2009. Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Med Vet Entomol* 23: 34–40.
44. Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
45. Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
46. Swofford DL, 2002. *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
47. Akaike H, 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr* 19: 716–723.
48. Nylander JA, 2004. *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
49. China WE, Miller NC, 1959. Check list and keys to the families and sub-families of the Hemiptera-Heteroptera. *Bull Brit Mus (Nat Hist)*. Ent 8: 3–45.
50. Ryckman RE, 1962. Biosystematics and hosts of *Triatoma protracta* complex in North America (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). *Univ California Publ Entomol* 27: 93–240.
51. Gómez-Sucerquia LJ, Triana-Chávez O, Jaramillo-Ocampo N, 2009. Quantification of the genetic change in the transition of *Rhodnius pallens* Barber, 1932 (Hemiptera: Reduviidae) from field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 871–877.

52. Noireau F, Gutierrez T, Flores R, Brenière F, Bosseno MF, Wisnivesky-Colli C, 1999. Ecogenetics of *Triatoma sordida* and *T. guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in the Bolivian Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 451–457.
53. Almeida CE, Marcet PL, Gumiel M, Takiya DM, Cardozo-de-Almeida M, Pacheco RS, Lopes CM, Dotson EM, Costa J, 2009. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *J Vector Ecol* 34: 164–173.
54. Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Galvão C, Steindel M, Pinto CJ, 2001. Nova Espécie do complexo *oliveirai* (Nova Denominação para o Complexo *matogrossensis*) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 71–79.
55. De Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ, 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylogenet Evol* 35: 712–718.
56. Diotaiuti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JC, 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Med Trop* 35: 237–245.
57. Diotaiuti L, Azeredo BV, Busek SC, Fernandes AJ, 1998. Controle do *Triatoma sordida* no peridomicílio rural do município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 3: 21–25.
58. Diotaiuti L, Paula OR, Falcão PL, Dias JC, 1995. Avaliação do programa de controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referência especial ao *Triatoma sordida*. *Bol Oficina Sanit Panam* 118: 211–219.
59. Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J, 2008. *Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil*. Rio de Janeiro, Brazil: Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora Ltda.
60. Almeida CE, Vinhaes MC, Almeida JR, Silveira AC, Costa J, 2000. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 761–768.
61. Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A, 2007. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Mol Biol Evol* 24: 1340–1346.
62. Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA, 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13486–13491 (PNAS).
63. Mas-Coma S, Bargues MD, 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop* 110: 112–136.

SUPPLEMENTAL TABLE 1
Uncorrected pairwise interspecific divergences (%) for each gene fragment*

A: 16S																					
(256bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1: Tbar																					
2: Tbra	4.4																				
3: Tcar	3.6	5.2																			
4: Tcir	4.0	4.8	1.2																		
5: Tcos	3.2	5.2	4.8	5.2																	
6: Tgar	4.4	8.7	7.9	8.3	6.7																
7: Tguas	4.8	5.2	2.4	2.0	5.2	8.3															
8: Tguaz	1.2	4.0	4.0	4.4	3.2	4.8	4.4														
9: Tinf	4.8	6.0	5.6	6.0	6.0	7.9	6.0	5.2													
10: Tjua	4.4	7.9	6.3	6.7	6.3	3.2	7.5	4.8	7.9												
11: Tklu	3.6	5.2	1.2	1.6	4.0	7.9	2.0	4.0	6.0	6.3											
12: Tmac	3.6	6.3	6.3	6.7	5.2	7.5	7.5	4.8	6.0	7.5	5.6										
13: Tmat	4.4	7.9	6.3	6.7	7.1	2.4	6.7	4.8	7.5	1.6	6.3	7.5									
14: Tpat	4.0	5.2	2.8	2.4	6.0	8.3	3.6	4.4	7.1	7.5	3.2	6.0	7.5								
15: Tpse	3.2	6.0	6.0	6.3	4.8	7.1	7.1	4.4	5.6	7.1	5.2	0.4	7.1	5.6							
16: Trub	3.6	4.8	1.6	2.0	5.6	7.9	2.4	3.2	5.6	6.3	2.0	6.3	6.3	3.6	6.0						
17: Tshe	4.0	1.2	6.0	5.6	4.8	8.3	6.0	4.4	6.3	8.3	5.2	5.2	8.3	5.6	4.8	5.6					
18: Tsor	4.4	7.1	7.1	7.5	7.1	2.8	8.3	4.0	8.7	3.6	7.1	7.5	2.8	7.5	7.1	6.3	7.5				
19: Tvan	4.0	7.5	6.0	6.3	6.7	2.8	7.1	4.4	7.5	1.2	6.0	7.1	1.2	7.1	6.7	6.0	7.9	2.4			
20: Twil	1.6	4.0	3.6	4.0	3.6	6.0	4.8	1.2	6.0	5.2	3.6	4.4	5.2	4.8	4.0	2.8	4.8	4.4	4.8		
21: Pmeg	11.1	10.7	12.3	11.9	12.3	14.3	11.5	12.3	12.3	13.5	12.3	10.7	12.7	11.5	10.3	12.7	11.1	14.7	13.1	11.5	
22: Rpro	17.9	19.4	19.4	20.2	17.9	19.4	19.8	17.9	18.7	20.6	19.4	18.7	20.2	19.8	18.3	19.8	19.8	21.0	20.2	17.9	21.0
B: Cytb																					
(313 bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17				
1: Tbar																					
2: Tbra	17.6																				
3: Tcos	14.3	18.4																			
4: Tguas	12.5	14.7	13.6																		
5: Tguaz	11.8	16.2	14.7	12.9																	
6: Tinf	18.8	14.0	15.8	16.9	15.8																
7: Tjua	17.6	8.1	17.3	14.3	16.5	16.2															
8: Tklu	15.8	16.2	15.1	12.5	10.7	12.9	16.2														
9: Tmac	14.3	15.1	17.3	15.1	12.5	15.4	15.4	12.1													
10: Tmat	14.3	16.2	16.2	4.8	13.6	17.6	14.0	12.5	14.3												
11: Tmel	16.5	9.6	16.5	14.3	16.9	13.2	11.0	15.1	14.3	15.4											
12: Tpse	14.3	14.3	16.5	14.3	12.5	14.7	14.7	11.4	0.7	13.6	13.6										
13: Trub	14.3	16.5	15.1	12.5	10.7	13.2	15.8	2.6	12.9	12.5	14.7	12.1									
14: Tsh	14.7	12.5	18.0	17.3	17.3	16.9	11.8	18.8	16.5	18.0	9.9	16.5	18.4								
15: Tsor	14.0	19.1	18.0	7.7	13.2	19.5	17.3	14.3	15.8	8.1	18.4	15.1	14.3	21.3							
16: Twil	11.4	16.5	14.3	12.5	1.1	15.4	16.9	10.3	12.9	12.5	17.3	12.1	10.3	18.4	12.1						
17: Pmeg	21.3	20.2	22.1	21.7	18.8	19.1	19.5	20.6	18.8	21.0	22.4	18.0	19.9	22.4	19.9	17.6					
18: Rpro	18.8	21.0	22.1	21.3	17.6	18.0	21.0	20.2	18.4	21.7	22.8	17.6	18.4	21.3	22.1	17.3	21.3				
C: COI																					
(202 bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16					
1: Tbar																					
2: Tcar	13.7																				
3: Tcir	15.0	3.1																			
4: Tcos	20.9	14.7	13.4																		
5: Tguas	16.8	8.5	7.4	13.3																	
6: Tguaz	11.9	8.6	8.6	13.4	10.3																
7: Tinf	20.1	14.8	14.8	16.7	18.6	17.4															
8: Tmac	17.3	18.7	20.0	19.9	17.4	19.3	23.6														
9: Tmat	19.4	15.1	13.2	16.9	11.3	13.8	25.8	17.4													
10: Tpse	16.9	8.6	10.4	12.1	14.0	11.0	14.9	20.8	18.5												
11: Trub	11.9	3.6	2.5	14.1	9.1	9.2	15.4	18.7	13.8	9.8											
12: Tshe	7.4	16.2	16.2	20.9	16.8	16.9	18.7	20.0	20.7	18.2	14.3										
13: Tsor	17.4	13.2	11.4	19.1	12.0	13.2	22.9	15.5	5.7	14.6	12.0	18.7									
14: Tvan	14.9	11.0	7.4	11.5	10.4	7.4	16.0	19.4	12.0	10.3	8.0	16.2	11.4								
15: Twil	13.7	9.2	8.0	14.1	9.7	1.5	18.0	19.3	14.5	10.4	8.6	18.9	12.6	6.9							
16: Pmeg	22.4	21.1	20.4	21.1	17.8	23.1	22.4	14.8	20.4	20.4	20.4	22.5	19.8	18.5	21.1						
17: Rpro	25.1	26.4	25.7	29.4	24.4	25.0	23.1	27.4	28.0	27.9	25.0	25.9	25.1	26.5	25.0	22.4					

*P-distances mentioned in the text are in bold.

Tbar = *Triatoma baratai*; Tbra = *T. braziliensis*; Tcar = *T. carvalhoi*; Tcir = *T. circummaculata*; Tcos = *T. costalimai*; Tgar = *T. garciabesi*; Tguas = *T. guasayana*; Tguaz = *T. guazu*; Tinf = *T. infestans*; Tjua = *T. juazeirensis*; Tklu = *T. klugi*; Tmac = *T. maculata*; Tmat = *T. matogrossensis*; Tpat = *T. patagonica*; Tpse = *T. pseudomaculata*; Trub = *T. rubrovaria*; Tshe = *T. sherlocki*; Tsor = *T. sordida*; Tvan = *T. vanda*; Twil = *T. williamsi*; Pmeg = *Panstrongylus megistus*; Rpro = *Rhodnius prolixus*.

Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy

João Aristeu da Rosa^{1/+}, Vagner José Mendonça², Cláudia Solano Rocha¹, Sueli Gardim¹, Mario Cilense³

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas ²Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista-Araraquara, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brasil ³Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

By macroscopic and microscopic dorsal side observation, it was noted that the IX and X segments of two species each of Panstrongylus and Triatoma terminate in an elongated way, whereas they terminate abruptly in the two species of Rhodnius. Scanning observation of the dorsal, ventral, lateral and posterior sides of the female genitalia of Panstrongylus herreri, Panstrongylus megistus, Rhodnius colombiensis, Rhodnius prolixus, Triatoma infestans and Triatoma vitticeps revealed that these six species are generally and specifically distinguished based on these elements. We describe several components that distinguish P. herreri from P. megistus: four on the dorsal side: the VII, VIII, IX and X segments, on the ventral view, three: VII sternite, VIII gonocoxite and VIII gonapophyse, on the lateral view one character, VIII gonocoxite and on the posterior view three characters: VIII and IX gonocoxite and XI gonopophyse. Comparing R. colombiensis and R. prolixus, there were three distinct characters on the dorsal side: the VII, VIII and X segments, on the ventral view three characters: the IX and X segments and VIII gonocoxite and on the posterior view four characters: the VIII, IX, X segments and VIII gonapophyse that distinguish the two species. T. infestans and T. vitticeps have four different characters on the dorsal side: the VII, VIII, IX and X segments, on the ventral view four characters: the VII and X segments, VIII gonocoxite and VIII gonapophyse, on the lateral view two characters, IX and X segments and on the posterior view four characters: the IX and X segments, VIII gonocoxite and VIII gonapophyse that distinguish the two species. Examination of the external female genitalia of six triatomine species by scanning suggests that these components are useful for taxonomical studies.

Key words: Triatominae - taxonomy - external female genitalia

Triatominae responsible for the transmission of *Trypanosoma cruzi* to humans and to a group of seven orders, 24 families and 150 species of domestic and wild vertebrates (WHO 2007). Although the incidence of Chagas disease has decreased, there are presumably 11 million people infected in the Southern Cone countries (Moncayo & Silveira 2009). Thus, studies on triatomines must continue, especially considering the wide distribution of these species in the Neotropical region, which includes Brazil.

There are 140 species of Triatominae (Rocha et al. 2009) and all of them are potential vectors of *T. cruzi* in the five nymphal instar stages and as adults. The characterisation of such species is necessary so that control actions can be taken and, additionally, they are important to phylogenetic and taxonomic studies.

The distinction of Triatominae is based on morphological characteristics, such as the male genitalia, a marker that has been largely used (Lent & Wygodzinsky 1979, Jurberg et al. 1998, Papa et al. 2002), although more recent descriptions have not used it (Costa et al. 2006, Galvão & Angulo 2006, Costa & Felix 2007). Morphometric studies are also utilised, such as egg mensuration (Santos et al. 2009).

The female genitalia and its appendages are frequently used for the distinction of some vectors, as with the spermatheca in many species of Phlebotominae (Marcodes et al. 1998, Galati 2003), but they have not been recently used in the case of Triatominae. Publications on the female genitalia of Triatominae by Lent (1948), Abalos and Wygodzinsky (1951), Sherlock and Serafim (1967) or Lent and Jurberg (1969); all of these studies were carried out through dissection and optical microscopy. Lent and Wygodzinsky (1979) explain that, "the genitalia of the female are rather uniform and furnish few taxonomic characters".

This paper describes the external female genitalia and the VII, VIII, IX and X segments of three genera by scanning electron microscopy (SEM). The species studied, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus herreri*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*, *Triatoma infestans* and *Triatoma vitticeps*, showed clear distinctions regarding the female genital characters observed on the dorsal, ventral, lateral and posterior sides.

Financial support: PADC/FCF/UNESP/Araraquara (2009/10-II), Fapesp (2009/52137-4)

+ Corresponding author: rosaja@fcf.ar.unesp.br

Received 24 August 2009

Accepted 12 March 2010

MATERIALS AND METHODS

This research included 32 specimens of triatomines from 17 colonies that are kept in the Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Araraquara.

A different number of specimens per species was utilised: two of *P. herreri* (Colônias de Triatominae Araraquara - CTA 118, 187), four of *P. megistus* (CTA 102, 146, 209, 257), 13 of *R. prolixus* (CTA 003, 015, 029, 033, 046, 048, 205), four of *R. colombiensis* (CTA 212), five of *T. infestans* (CTA 007, 064) and four of *T. vitticeps* (CTA 041) (Table I).

After euthanasia, the triatomines were transversely cut in the 6th abdominal segment, washed, dehydrated in an alcohol series and oven-dried at 50°C, according to Rosa et al. (2005). Subsequently, they were fixed on aluminium stubs by the 6th abdominal segment so that the terminal portion formed an angle of 90° with the support base. Afterwards, sputtering metallisation was performed for 2 min at 10 mA. Then the dorsal, ventral, lateral and posterior sides were examined by a Topcon SM 300 SEM at the Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

RESULTS

Dorsal side - Macroscopic and microscopic examination of the dorsal side of *P. herreri*, *P. megistus*, *T. infestans* and *T. vitticeps* shows that their last abdominal segments end in an elongated way, while in *R. colombiensis* and *R. prolixus* such structures end abruptly.

The use of SEM led to the finding that there is a clear separation between the VII and VIII tergites in *P. herreri*, whereas such separation is not as pronounced in *P. megistus*, especially in the central portion, where the two segments appear together. *P. megistus* has the IX tergite and the X segment, which are more elongated and have a conical shape. Although these structures are also elongated in *P. herreri*, they do not have a clearly conical shape (Fig. 1A, B).

In *P. herreri* and *P. megistus*, the IX tergite stands completely separated from the X segment. *P. herreri* has the two lateral borders of the IX tergite segment raised, while in *P. megistus* this segment is flat. In *P. herreri*, the IX tergite is half the length of the same structure in *P. megistus*, but both have the same width. The X segment is 1.5 times larger in length in *P. megistus* than in *P. herreri* (Fig. 1A, B).

The line separating the VII and VIII tergites is curved and continuous in *R. prolixus*, but in *R. colombiensis* it has an inflection in the central part. The final portion of the X segment is large in *R. colombiensis* and narrow in *R. prolixus*. The edge of the IX tergite of *R. prolixus* has 1 + 1 protuberances that do not exist in *R. colombiensis* (Fig. 1C, D).

T. infestans shows 1 + 1 callosities next to the dividing line between the VIII and VII tergites, as well as between the IX tergite and the X segment. These callosities are not seen in *T. vitticeps*. Lateral portions of the IX tergite have an expanded shape in *T. infestans*, a feature

TABLE

Species, colonies and origin of the triatomines used for the characterization of female genitalia by scanning electron microscopy

Species	Colonies	Origin	Initiated
<i>Panstrongylus herreri</i>	CTA 118	Vale do Rio Utoubamba, Peru	25 Oct 1984
	CTA 187	Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil	17 Jan 1997
<i>Panstrongylus megistus</i>	CTA 102	Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo (SP), Brazil	2 Aug 1984
	CTA 146	Boca da Mata, Alagoas, Brazil	11 Feb 1985
	CTA 209	Sítio Carandá, Araraquara, SP, Brazil	11 Apr 2000
	CTA 257	Sítio Carandá, Araraquara, SP, Brazil	16 Oct 2007
<i>Rhodnius prolixus</i>	CTA 003	Bogotá, Colombia	15 Dec 1976
	CTA 015	Colômbia	5 Oct 1972
	CTA 029	FMUSP, SP, Brazil	9 Aug 1982
	CTA 033	Bogotá, Colombia	15 Dec 1976
	CTA 046	Costa Rica	25 May 1983
	CTA 048	Venezuela	25 May 1983
	CTA 205	Ortiz Caseiro, Edoguarica, Venezuela	5 Sep 1999
<i>Rhodnius colombiensis</i>	CTA 212	Tolima, Colombia	15 Feb 2001
<i>Triatoma infestans</i>	CTA 007	Mambaí, Goiás, Brazil	28 Feb 1980
	CTA 064	Peru	5 Aug 1983
<i>Triatoma vitticeps</i>	CTA 041	Minas Gerais, Brazil	25 Jul 1968

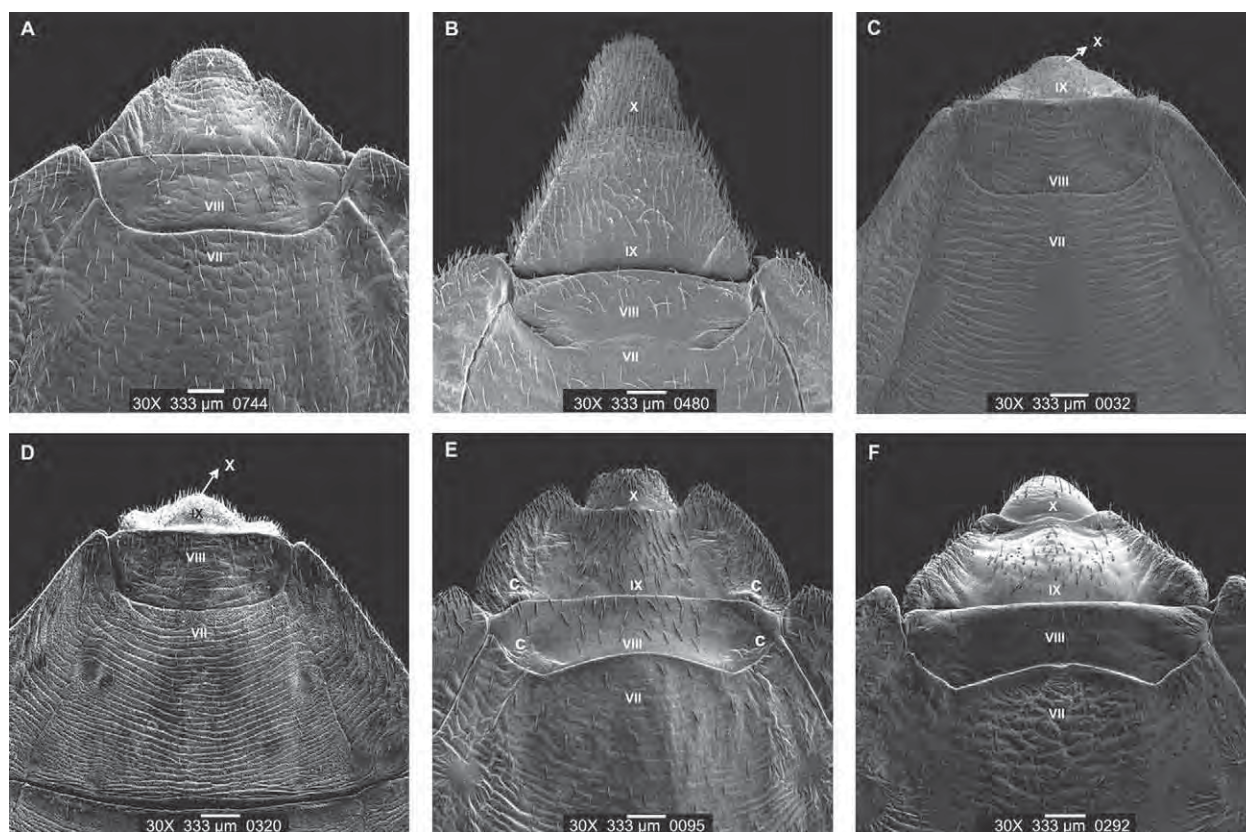


Fig. 1: female external genitalia of six species of triatomines by scanning electron microscopy, dorsal side. A: *Panstrongylus herreri*; B: *Panstrongylus megistus*; C: *Rhodnius colombiensis*; D: *Rhodnius prolixus*; E: *Triatoma infestans*; F: *Triatoma vitticeps*; c: callosities; VII, VIII, IX tergites and X segment;

not observed in *T. vitticeps*. The dividing line between the IX tergite and X segment has three lobules in *T. vitticeps*, whereas in *T. infestans* the two lateral apices are raised (Fig. 1E, F).

Ventral side - By using SEM, it can be noted that the portion after the VII sternite, that constitutes external genitalia structures, is three times longer in *P. megistus* than in *P. herreri*. The sinuous, not the curved, portion of the VII sternite with the pair of VIII gonocoxites has greater curvature in *P. megistus* than in *P. herreri*.

The pair of VIII gonocoxites is about four times longer in *P. megistus* than in *P. herreri*. With respect to the widths of the bases, the ratio is about three to two, respectively. Although there is a difference in the length and the width of the VIII gonapophyses of these two species, the difference is not as evident as in the case of the VIII gonocoxites. A pair of IX gonocoxites can be observed in *P. megistus* but not in *P. herreri* (Fig. 2A, B).

In *R. colombiensis*, the VIII gonocoxites are large, whereas in *R. prolixus* they have a subtriangular shape. Although the VIII gonapophyses are subtriangular in both species of *Rhodnius*, they are thinner in *R. prolixus*. The final portion of the X segment is large in *R. colombiensis* and narrow in *R. prolixus*. In these two species, no difference was identified in the shape of the IX gonocoxites. On

the other hand, the ventral view shows quite a noticeable difference in the IX gonocoxite: in *R. colombiensis* this structure has a curved border, while in *R. prolixus* it is a dilated lateral border (Fig. 2E, F).

The dividing line between the VII sternite and the pair of VIII gonocoxites has higher curvature in *T. vitticeps* than in *T. infestans*. Although the shape of the VIII gonocoxite is similar in both species, they are larger in *T. infestans*. The VIII gonapophyses also present a triangular shape, but they are more elongated in *T. infestans* than in *T. vitticeps*. The ventral view also clearly shows the lateral expansions of the IX sternite referred to earlier in the dorsal side of *T. infestans*. In addition, this species presents a straight final portion of the X segment, whereas the same portion is curved in *T. vitticeps* (Fig. 2F, G).

Lateral side - SEM observation of the lateral view also shows a difference between the VIII gonocoxites of *P. megistus* and *P. herreri*, the former having triangular and much larger structures, while in the latter they are half-moon shaped. In these two species the VIII gonocoxites establish the connection with the IX and X segments (Fig. 3A, B).

The lateral view shows that in *R. colombiensis* and *R. prolixus* the IX and X segments are inflected towards the ventral portion, indicating an abrupt termination in

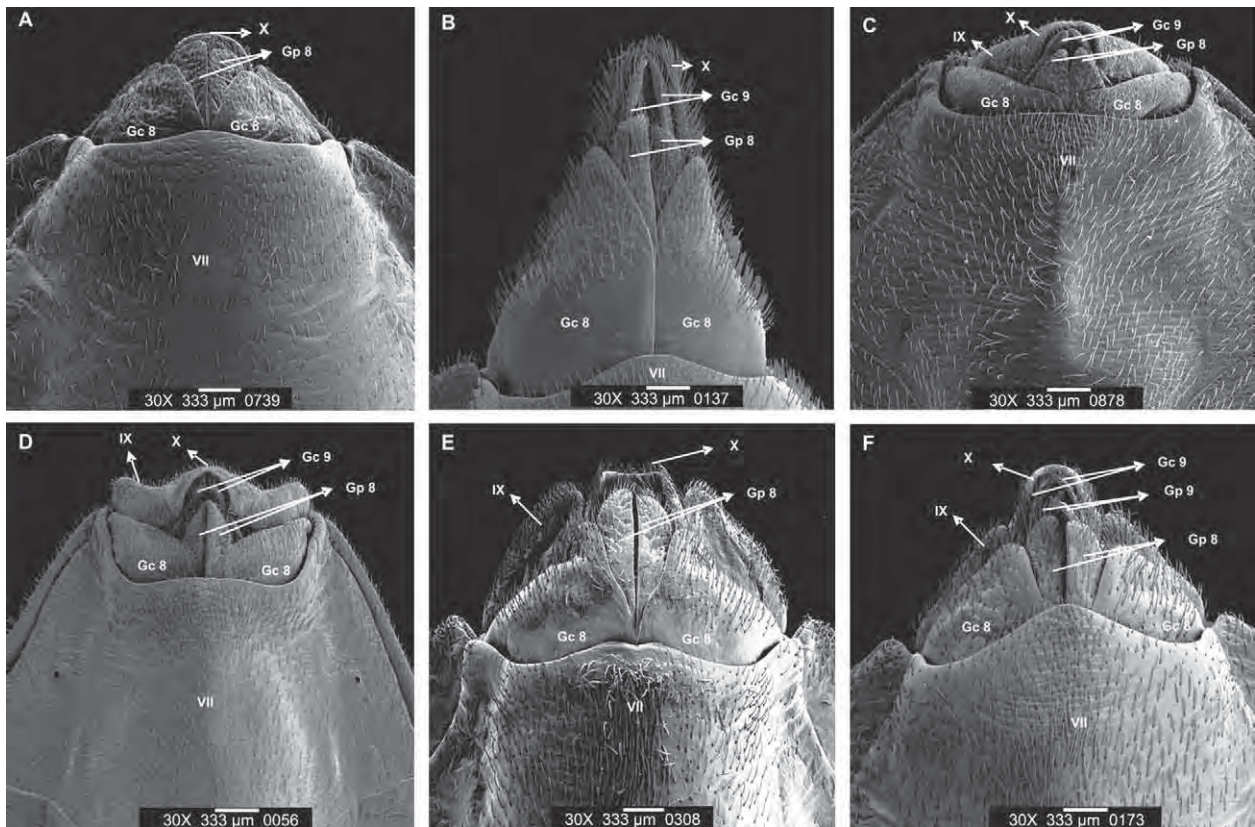


Fig. 2: female external genitalia of six species of triatomines by scanning electron microscopy, ventral side. A: *Panstrongylus herreri*; B: *Panstrongylus megistus*; C: *Rhodnius colombiensis*; D: *Rhodnius prolixus*; E: *Triatoma infestans*; F: *Triatoma vitticeps*; Gc8: gonocoxite VIII; Gc9: gonocoxite IX; Gp8: gonapophyse VIII; Gp9: gonapophyse IX; VII and IX sternites and X segment.

macroscopic observation, as mentioned earlier. In these two species of *Rhodnius*, the VIII gonocoxites are limited to the IX and X segments (Fig. 3C, D).

Also in the lateral view, *T. infestans* and *T. vitticeps* differ in the way that the IX and X segments are disposed. In the former, they are in a flat position, whereas in the latter they are ventrally curved, although not as much as in the case of *R. colombiensis* and *R. prolixus*. In the two species of *Triatoma*, it is noted that the VIII gonocoxite is limited to the IX segment and is not seen on the X segment (Fig. 3E, F).

Posterior side - Observation of the female genitalia segments in samples positioned at an angle of 90° by SEM reveals that these segments are larger in *P. megistus* than in *P. herreri*. The VIII gonocoxites of the latter are distinctly wider and shorter than those of the former, which are longer and narrower. The VIII gonapophyses of *P. megistus* are external and exceed the final portion of the X segment. In *P. herreri*, the VIII gonapophyses have a triangular shape, which is different from *P. megistus*, which has them elongated. The IX gonocoxites are visible in *P. herreri* but not in *P. megistus* (Fig. 4A, B).

In *R. colombiensis* and *R. prolixus*, the posterior view, also at 90°, shows that the IX and X segments are not separated as in *P. herreri*, *P. megistus* and *T. vitticeps*

but that there is a shallow dividing line. Therefore, the IX and X segments look like a single piece whose shape resembles an equilateral triangle in *R. prolixus* and an isosceles triangle in *R. colombiensis*. At the terminal parts of the VIII tergite, between the VII and IX segments and the VIII gonocoxite, there are 1 + 1 external appendices in *R. colombiensis* and in *R. prolixus* these structures are smaller and not exteriorized. In the posterior view there is no difference between the VIII gonocoxites of these two species, but the VIII gonapophyses are larger in *R. prolixus* (Fig. 4C, D).

In *T. infestans*, the IX and X segments appear linked on the central portion and separated on the lateral sides. In contrast, they only appear separated in *T. vitticeps*. Both the VIII gonocoxite and VIII gonapophyse are almost triangular in the two species of *Triatoma* but larger in *T. vitticeps* (Fig. 1E, F).

DISCUSSION

Lent (1948), while describing the female genitalia of *R. prolixus* as observed by optical microscopy, suggested that this structure consists of the VII sternite, the anterior, median and posterior gonapophyses and the terminal segments (IX and X).

Abalos and Wygodzinsky (1951) used optical microscopy to describe the female genitalia of 11 species of

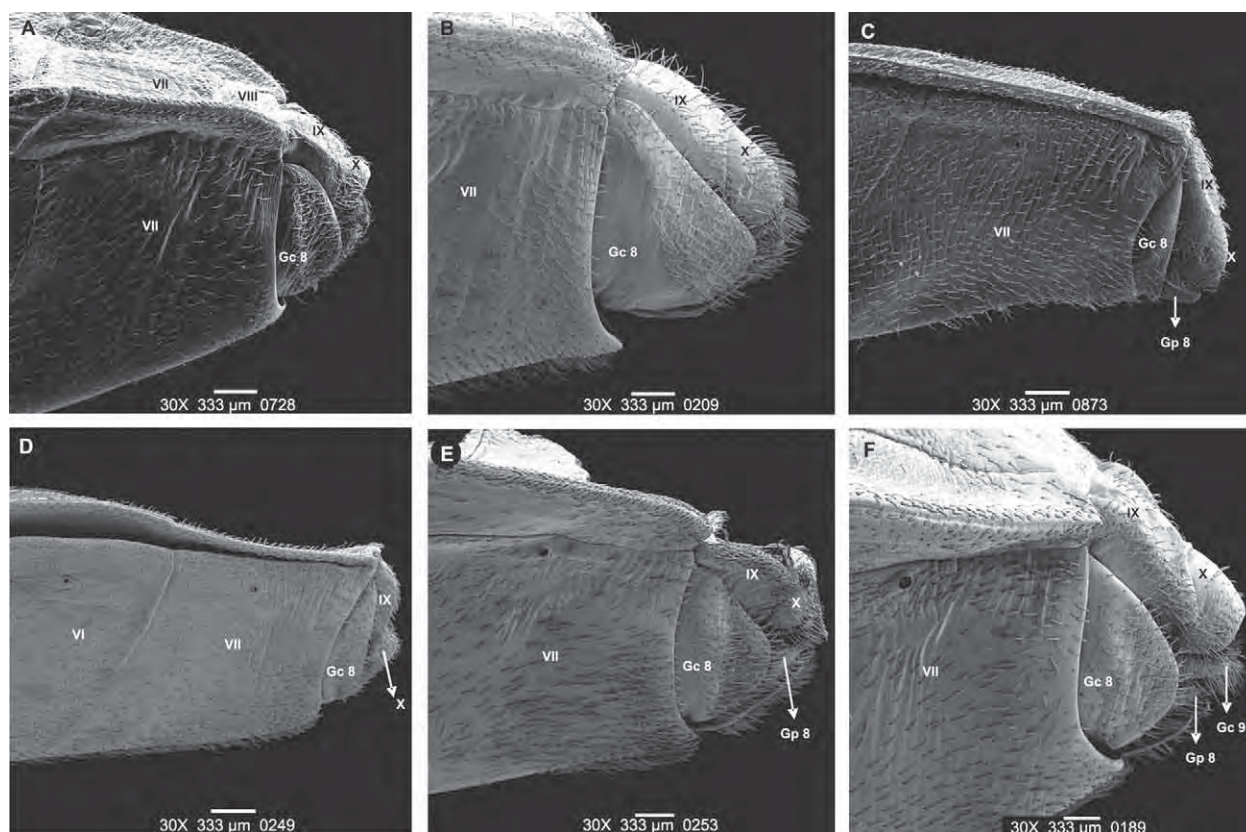


Fig. 3: female external genitalia of six species of triatomines by scanning electron microscopy, lateral side. A: *Panstrongylus herrerii*; B: *Panstrongylus megistus*; C: *Rhodnius colombiensis*; D: *Rhodnius prolixus*; E: *Triatoma infestans*; F: *Triatoma vitticeps*; Gc8: gonocoxite VIII; Gc9: gonocoxite IX; Gp8: gonapophyse VIII; VI and VII sternites and VII, VIII, IX tergites and X segment.

Triatoma, three of *Panstrongylus* and one *Psammolestes coreodes*. These descriptions revealed some species of *Triatoma* that were alike with respect to the shape of the gonapophyses and other species that were different in this aspect. The researchers examined *P. megistus*, *Panstrongylus guentheri* and *Panstrongylus geniculatus*; the first had more differences and the other two were similar to each other.

In this study by SEM, *P. megistus* appeared very different from *P. herrerii*, as well as from the two species of *Rhodnius* and the two of *Triatoma*. This distinction was noted on the dorsal, ventral, lateral and posterior sides (Figs 1-4).

Lent and Jurberg (1969) studied the female genitalia of 10 species of *Rhodnius* by dissection and optical microscopy. These techniques allowed for the identification and schematic drawing of gonocoxites and gonapophyses. According to this study, it is acknowledged that the genitalia is constituted of the gonocoxites and the gonapophyses, with the IX gonocoxite and the IX gonapophyse being distinct in the 10 species of *Rhodnius* studied by the authors.

Sherlock and Serafim (1967), in the description of *Triatoma lenti*, characterise the female genitalia of this species by scheme. When Bérenger and Pluot-Sigwalt

(2002) revalidated *Rhodnius amazonicus*, they also carried out the characterization of the female genitalia of the same species, as well as of *Rhodnius pictipes*.

The study of the dorsal side of female genitalia of *P. herrerii* and *P. megistus* carried out by SEM revealed that they present differences in the shape of the dividing line between the VII and VIII tergites, as well as in the length of the IX tergite and X segments (Fig. 1A, B). With regard to the ventral side, the differences between the two species can be noted in the shape of the dividing line between the VII sternite and the VIII gonocoxites, in the shape and size of the VIII gonapophyses. The IX gonocoxites are only visible in *P. megistus* (Fig. 2A, B). On the posterior side, *P. herrerii* and *P. megistus* differ from each other in the length and the shape of the IX tergite and the X segment, in the shape of the VIII and IX gonocoxites and in the fact that the VIII gonapophyses are not external in *P. megistus* (Fig. 2A, B).

The female genitalia of *R. colombiensis* and *R. prolixus*, when observed from the dorsal portion by SEM, show differences regarding the shape of the line that separates the VII and VIII tergites and the configuration acquired by the IX tergite segment (Fig. 1C, D). On the ventral side there are differences in the shape of the VIII gonocoxites and the VIII gonapophyses, as well as in

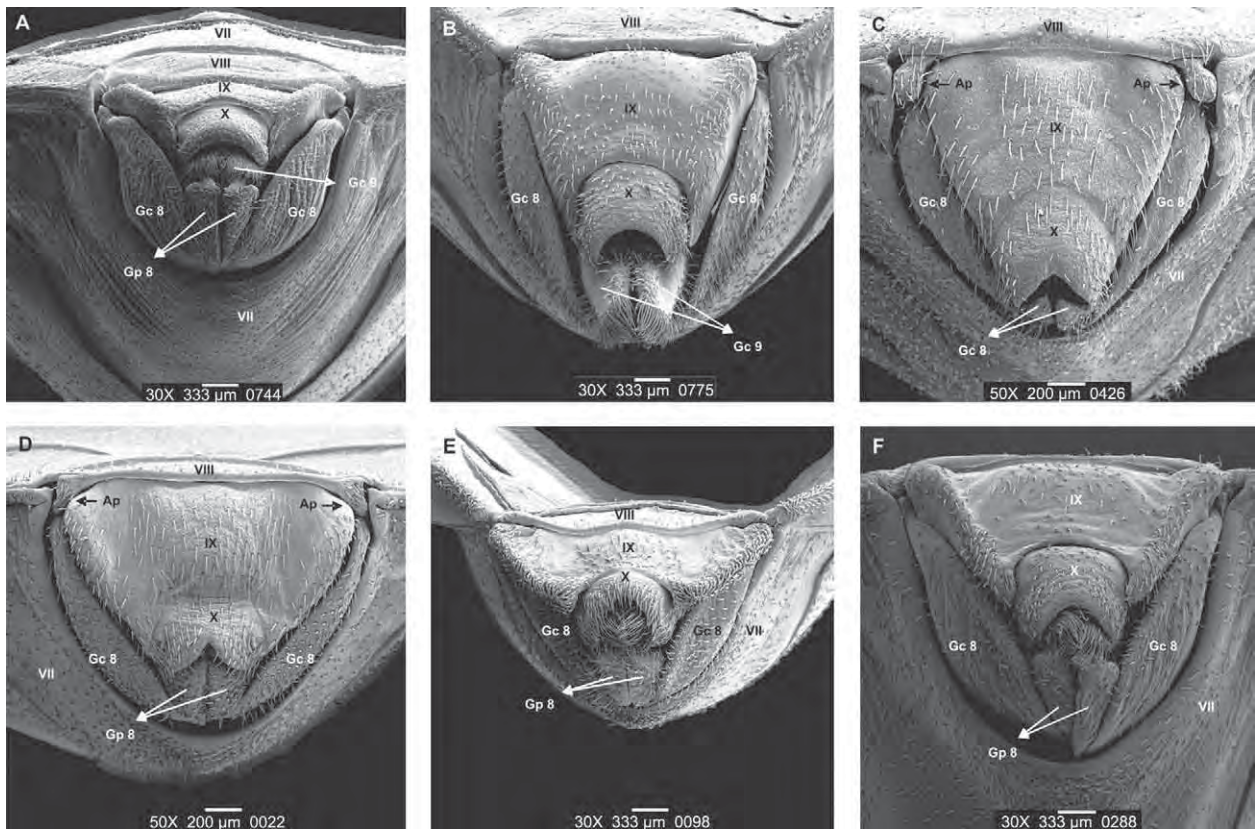


Fig. 4: female external genitalia of six species of triatomines by scanning electron microscopy, posterior side. A: *Panstrongylus herreri*; Ap: appendices; B: *Panstrongylus megistus*; C: *Rhodnius colombiensis*; D: *Rhodnius prolixus*; E: *Triatoma infestans*; F: *Triatoma vitticeps*; Gc8: gonocoxite VIII; Gc9: gonocoxite IX; Gp8: gonapophyse VIII; Gp9: gonapophyse; VII sternite and VII, VIII, IX tergites and X segment.

the shape of the IX and X sternites (Fig. 2C, D). Finally, from the posterior view a pair of appendices of the VII tergite is external in *R. colombiensis* but not in *R. prolixus*. Other differences are the shape of the IX segment and the size of the VIII gonapophyses (Fig. 4C, D).

T. infestans and *T. vitticeps* can be distinguished by means of the female genitalia observed on the dorsal side by scanning, considering that the first species presents 2 + 2 callosities placed in the VIII and IX tergite segments, whereas there are no such callosities in the second. Another point of distinction is the shape of the IX tergite and the X segment (Fig. 1E, F). From the ventral view a difference can be noted in the shape of the dividing line between the VII sternites and the VIII gonocoxites, as well as in the size of the VIII gonocoxites and VIII gonapophyses and in the shape of the X segments (Fig. 2E, F). The posterior view shows differences in the size and shape of the IX tergite and the X segment and also in the size of the VIII gonocoxites and the VIII gonapophyses (Fig. 4E, F).

In brief, it was noted that female genitalia of *P. herreri* and *P. megistus* present four distinct elements on the dorsal side, three on the ventral side, one on the lateral side and three on the posterior side (Figs 1-4).

Similarly, between *R. colombiensis* and *R. prolixus* there are three distinct characters on the dorsal side, three on the

ventral side and four on the posterior side (Figs 1, 2, 4).

T. infestans and *T. vitticeps* distinguish each other by female genitalia in four characters on the dorsal side, four on the ventral side, two on the lateral side and four on the posterior side (Figs 1, 2, 4). For the six species studied, there was a total of 11 distinct characters on the dorsal side, 10 on the ventral side, three on the lateral side and 11 on the posterior side (Figs 1-4).

Another characteristic that is visible in the dorsal, ventral, lateral and posterior view of *P. megistus* is a larger quantity of sensilla when compared to the same segments of *P. herreri*. In *R. colombiensis*, the sensilla are uniformly distributed, but the same does not occur in *R. prolixus* in the ventral view. *T. infestans* shows more sensillae on the dorsal side than *T. vitticeps* (Figs 1-4). This characteristic was noted earlier in 10 *Rhodnius* species by Lent and Jurberg (1969), as they had observed a large number of sensillae in the gonocoxite 9.

This study of the female genitalia by scanning six species (2 of *Panstrongylus*, 2 of *Rhodnius* and 2 of *Triatoma*) shows that the description of such characters can be valuable for a more specific species definition, indicating that it can contribute to the phylogenetic and taxonomic study of the 140 species attributed to the subfamily Triatominae.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. José Maria Soares Barata, Professor of the Faculdade de Saúde Pública/USP, who donated 136 colonies of 36 species of Triatominae to the Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP-Araraquara, and to Bento Gregório de Jesús, João Luiz Molina Gil and João Maurício Nóbrega Filho, who were responsible for the maintenance of the colonies from 1983-2007.

REFERENCES

- Abalos JW, Wygodzinsky P 1951. *Las Triatominae argentinas (Reduviidae: Hemiptera)*, Universidad Nacional de Tucuman, Argentina, 179 pp.
- Bérenger JM, Pluot-Sigwalt D 2002. *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973, bona species, close to *R. pictipes* Stål, 1872 (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 73-77.
- Costa J, Argolo A, Felix M 2006. Redescription of *Triatoma melanica*, Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-58.
- Costa J, Felix M 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- Galati EAB 2003. Morfologia e taxonomia. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 53-175.
- Galvão C, Angulo VM 2006. *Belminus corredori*, a new specie of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) form Santander, Colômbia. *Zootaxa* 1241: 61-68.
- Jurberg J, Lent H, Galvão C 1998. The male genitalia and its importance in taxonomy. In RU Carcavallo, I Gálfndez Girón, J Jurberg, H Lent (eds.), *Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas*, vol. 1, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 85-106.
- Lent H 1948. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Bras Biol* 8: 297-339.
- Lent H, Jurberg J 1969. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Rev Bras Biol* 29: 487-560.
- 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: 123-520.
- Marcondes CB, Lozovei AL, Galati EAB, Taniguchi HH 1998. The usefulness of Bergmann's rule to the distinction of members of *Lutzomyia intermedia* species complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 363-364.
- Moncayo A, Silveira AC 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 17-30.
- Papa AR, Jurberg J, Carcavallo RU, Cerqueira RL, Barata JMS 2002. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Entomol Vect* 9: 133-146.
- Rocha DS, Jurberg J, Rosa JA, Schaefer CW, Galvão C 2009. Description of eggs and instars of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 based on optical and scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 2064: 1-20.
- Rosa JA, Barata JM, Barelli N 1995. Morphology of abdominal bristles determined by scanning electron microscopy in six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 487-488.
- Rosa JA, Medeiros MP, Cilense M, Barata JMS 2005. Morphological study of the thorax of the nymphal instars of *Triatoma arthur-neivai* Lent & Martins (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Rev Bras Entomol* 49: 289-293.
- Santos CM, Jurberg J, Galvão C, Rosa JA, Ceretti Júnior W, Barata JMS, Obara MT 2009. Comparative descriptions of eggs from three species of *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1012-1018.
- Sherlock IA, Serafim EM 1967. *Triatoma lenti* sp.n., *Triatoma pessoai* sp.n. e *Triatoma bahiensis* sp.n. do estado da Bahia, Brasil (Hemiptera: Reduviidae). *Gaz Med Bahia* 67: 75-92.
- WHO - World Health Organization 2007. *Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas*, World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Argentina, 96 pp.



Article

urn:lsid:zoobank.org:pub:4ABD0501-A1CC-4AF6-8122-045267648750

Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil

JOÃO ARISTEU DA ROSA^{1,9}, CLÁUDIA SOLANO ROCHA¹, SUELI GARDIM¹, MARA CRISTINA PINTO¹, VAGNER JOSÉ MENDONÇA^{1,2}, JÚLIO CÉSAR RENTE FERREIRA FILHO¹, ELAINE OLIVEIRA COSTA DE CARVALHO³, LUÍS MARCELO ARANHA CAMARGO^{4,5}, JADER DE OLIVEIRA^{1,6}, JULIANA DAMIELI NASCIMENTO^{1,6}, MARIO CILENSE⁷ & CARLOS EDUARDO ALMEIDA^{1,8}

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

²Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – Campus Ariquemes, RO, Brasil

⁴Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO, Brasil

⁵Instituto de Ciências Biomédicas V, Universidade de São Paulo (USP), Monte Negro, RO, Brasil

⁶Departamento de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), SP, Brasil

⁷Departamento de Físico-Química, Instituto de Química (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

⁸Biodiversity Institute, University of Kansas, Dyche Hall, 1345 Jayhawk Blvd, Lawrence, KS 66044-7593, USA.

⁹Corresponding author. E-mail: joaoaristeu@gmail.com

Abstract

We present here a multisource approach that takes advantage of several disciplines to address a taxonomic issue. A triatomine related to *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 was recently found in the state of Rondônia, Brazil. The name *Rhodnius montenegrensis* n. sp. is suggested because it was found in the municipality of Monte Negro. The main differences between these two species can be detected in the female and male genitalia, but there are also noticeable differences in their eggs. Molecular analysis using PCR-RFLP technique and Bayesian inferences based on a fragment of the Cytochrome *b* (Cyt *b*) gene corroborated the morphological findings. We used this integrative approach to address the taxonomic decision for a new *Rhodnius* species and its relationship with others of this genus. Results obtained herein stress that morphology must be used as the major approach for obtaining phenotypic information, and molecular data should be taken as a complementary tool.

Key words: new species, *Rhodnius montenegrensis*, *Rhodnius robustus*

Introduction

Triatomines have epidemiological importance because they are responsible for the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) to humans, and also because they are a fundamental link for keeping the zoonotic cycle of such a protozoan among wild animals in peridomestic and domestic habitats.

There are 18 acknowledged genera of triatomines (Galvão *et al.* 2003; Forero *et al.* 2004). The genera *Panstrongylus*, *Rhodnius*, and *Triatoma* are those with the highest number of species and contain the most prevalent and relevant species regarding the transmission of *T. cruzi* to humans.

Among the described triatomines, the genus *Rhodnius* is the easiest to identify by external morphological examination; however, the specific separation involves several difficulties, as already noticed by Neiva and Pinto: “The genus *Rhodnius* is well characterized, which does not happen to the species that constitute it” (Neiva & Pinto 1923).

In 2007, samples of a *Rhodnius* were collected in 100 properties within the municipality of Monte Negro, state of Rondônia, including 75 males, 61 females, 53 fifth instars, 46 fourth instars, 70 third instars, 23 second instars, and 3 first instars. These specimens raised some doubts regarding their specific definition, but they were assumed

to be *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927 because of their geographical distribution. Then, on September 18th, 2008, another eight samples were collected in the same municipality, with the same morphological features. To clarify the doubts, we decided to keep a colony of these *Rhodnius*.

The description of this new *Rhodnius* species was made by comparing some structures with a phenotypically closely related species, *R. robustus*. The characters used were morphology of female genitalia, median process of the pygophore and phallus of the male genitalia, eggs, first urotergite, scutellum, morphometry, head, thorax, and abdomen. Molecular analyses, such as mitochondrial Cytochrome *b* (Cyt *b*) gene sequencing and PCR-RFLP techniques, were also carried out.

Material and methods

The specimens used for the morphological, morphometric, and molecular description were obtained from the colonies kept at the Triatominae Insectarium of the Department of Biological Sciences of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil. The colony named CTA 088 (Triatominae Colonies of Araraquara—originally abbreviated as CTA) consisted of the first eight *Rhodnius* sp. specimens collected on September 18th, 2008, from *babassus* (*Orbignya phalerata*) within a pasture area located at C – 35 line, coordinates S: 10° 10' 05.1" and W: 63° 24' 09.1," in the municipality of Monte Negro, Rondônia, Brazil (Fig. 1). The morphological features of the species matched those previously observed in the 136 adult specimens from the same municipality (Fig. 2).

For the comparative study, specimens from four *R. robustus* colonies (CTA 083, 084, 085, and 086) were examined. The CTA 083 and 084 colonies originated from specimens brought from Peru, and have been kept since August 1973. The CTA 085 colony was also brought from Peru, and has been kept since February 1972. The CTA 086 colony came from Madre de Diós, Peru, and has been kept since August 1973 (Fig. 3). This municipality is located in the Amazon jungle bordering Brazil, which is an area known for the occurrence of this species (Lent and Wygodzinsky 1979). The comparisons between the new species of *Rhodnius* (males and females) and *R. robustus* were based on the characteristics of the latter found in the dichotomous key of Lent and Wygodzinsky 1979. The descriptions of *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993; *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999; *Rhodnius milesi* Valente *et al.*, 2001; and *R. zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão, 2009 were also considered.

All morphological features analyzed herein for *R. robustus* from CTA colonies were compared and confirmed with samples of this same species which came from the National and International Laboratory of Reference in Triatominae Taxonomy from the Oswaldo Cruz Institute. These specimens had their taxonomy confirmed by using molecular and morphological approaches (Cleber Galvão, pers. comm.).

A Leica MZ APO stereoscopic microscope and the Motic Images Advanced software, version 3.2, were used for measurements and to study the male phallic structures and the process of the first urotergite.

Fifteen males and 15 females were measured together with 15 eggshells (Naegele *et al.* 2003; Rosa *et al.* 2003). The characters measured were: total length of the triatomines (TL), length of the head (HL), length of the antenna segments (A1, A2, A3, and A4) and rostrum segments (R1, R2, and R3), inner distance between eyes (IE), anteocular (AO) and post-ocular distances (PO), diameter of the eye (DE), maximum abdomen (MWA) and thorax widths (MWT), eggshell area, length, width, and diameter of the opercular aperture (Lent and Wygodzinsky 1979; Dujardin *et al.* 1999a; Rosa *et al.* 2000).

To obtain images of eggs, external female genitalia, scutellum, and first urotergite of 35 specimens of the new species of *Rhodnius* and 32 specimens of *R. robustus*, samples were examined by scanning electron microscopy under a Topcon SM-300 microscope (Barata 1981; Rosa *et al.* 1999; Quintero 2002; Obara *et al.* 2007; Rosa *et al.* 2010).

Geometric morphometric techniques were applied to wings to evaluate whether this morphotype exhibited any differences in shape compared to *R. robustus*, according to Campos *et al.* (2011) and Almeida *et al.* (2012). Seven anatomical landmarks (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2008) (Fig. 4) were collected at intersections between venations and processed by the same researcher using modules available at the CLIC (Collection of Landmarks for Identification and Characterization, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html>) (Dujardin *et al.* 2010), and the COOWin software (Dujardin 2004), as described by Dujardin (2008). Right forewings of 18 females of *R. robustus* and 23 of new *Rhodnius* species were used to evaluate the shape variables. Analyses were computed as nonuniform

(partial warps) and uniform components, which describe regional and global deformations of the wing architecture (Bookstein 1991). Prior to the generalized procrustes analysis, an isometric estimator of size variation (centroid-size) was calculated as the square root of the sum of the squared distances between the center of the configuration of landmarks and each individual landmark (Bookstein 1991). A factorial map was built to illustrate the variation, which resulted from the first and second principal components of the analysis, representing 95% of the shape.

The phylogenetic reconstruction of the new *Rhodnius* species was developed using primers according to Lyman *et al.* (1999). *Cyt b* gene fragments from insects of the CTA insectarium and the new *Rhodnius* species were aligned with some fragments downloaded from GenBank. The dendrogram was constructed by Bayesian analyses with the MrBayes software (Huelsenbeck & Ronquist 2001) using the alignment of a 369pb of the *Cyt b* gene. The support of the clades was estimated using a Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm performed by the MrBayes software, version 3.1.2. The first analysis was run for 1,000,000 generations, with sampling of every 250 generations. Estimates of likelihood settings were calculated using MrModeltest (Nylander *et al.* 2004), and the Akaike information criterion (AIC) was chosen to obtain the best model to be applied to the gene fragment. For *Cyt b*, the general model of DNA substitution with gamma rate variation across sites (HKY + G) was used, with two substitution types that only distinguish between transitions and transversions ($nst=2$). *Rhodnius brethesi* Matta, 1919; *R. ecuadoriensis* Lent & León, 1958; *R. neglectus* Lent, 1954; *R. pallescens* Barber, 1932; *R. pictipes* Stal, 1872; *R. prolixus* Stal, 1859; and *R. robustus* were compared with the new *Rhodnius* species. *Triatoma infestans* (Klug, 1834) and *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) were used as outgroups.



FIGURE 1. Localization of Monte Negro municipality where is collected *R. montenegrensis* n. sp. (S: 10° 10' 05,1" and W: 63° 24' 09,1").

Systematics

Rhodnius montenegrensis n. sp.

Holotype. ♀, BRAZIL: Triatominae Insectarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Unesp, Araraquara, SP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1. 2012.

Paratypes. BRAZIL: 8♀, 8♂, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, RJ, Avenida Brasil, 4365. 2012.

Etymology. The name *Rhodnius montenegrensis* was chosen because this species was found in the municipality of Monte Negro, state of Rondônia, Brazil.

Description. Length of male 18.49 ± 0.82 mm, of female 21.54 ± 0.75 mm, width of pronotum of male 3.99 ± 0.32 mm, of female 4.54 ± 0.26 mm; width of abdomen of male 6.16 ± 0.39 mm, of female 6.95 ± 0.39 mm (Table 1).

TABLE 1. Mean of measurement (mm) of 15 specimens of *Rhodnius montenegrensis* and *Rhodnius robustus*, females and males.

	Female		Male	
	<i>R. montenegrensis</i>	<i>R. robustus</i>	<i>R. montenegrensis</i>	<i>R. robustus</i>
HL	4.81	4.06	4.45	3.80
IE	0.63	0.68	0.59	0.61
AO	2.97	2.39	2.73	2.23
PO	0.83	0.79	0.78	0.73
DE	1.22	1.08	1.16	0.99
R1	0.82	0.97	0.85	0.90
R2	3.81	3.29	3.56	3.03
R3	0.93	0.96	0.85	0.92
TL	21.54	18.96	19.29	18.49
MWT	4.54	4.14	3.99	3.99
MWA	6.95	6.56	6.16	6.09
A1	0.44	0.38	0.49	0.37
A2	3.94	3.19	4.00	3.28
A3	2.63	2.39	2.54	2.30
A4	1.53	1.61	1.53	1.54

HL, head length; **IE**, inner distance between eyes; **AO**, antocular distance; **PO**, postocular distance (excluding neck); **DE**, diameter of the eye; **R1**, **R2**, and **R3**, lengths of first, second, and third rostral segments, respectively; **TL**, Total length of the Triatominae; **MWT**, maximum width of the thorax; **MWA**, maximum width of the abdomen; **A1**, **A2**, **A3** and **A4**, 1st, 2nd, 3rd and 4th antennal segments, respectively. The values in bold were significant at $\alpha = 0.05$, using unpaired t-test.

General color yellow with longitudinal dorsal black stripes on pronotum, wings, and connexivum (Fig. 2A).

Head of male and female with no spots, from clypeus to neck, with a central yellow stripe located between two (1+1) continuous brown stripes. Neck with a brown mark and a yellow central circular mark (Fig. 2A). Head length, inner distance between eyes, antocular distance, postocular distance (excluding neck), diameter of the eye, lengths of 1st, 2nd, and 3rd-rostral segments, respectively, and 1st, 2nd, 3rd, and 4th-antennal segments, respectively, are shown in Table 1.

Mesothoracic wings with well-demarcated veins, notably subcostal (Sc) vein with its yellow color (Fig. 4). Legs: yellow, except for a black stripe posteriorly to tibia, near tarsus (Fig. 2). Mesosternum with lateral stripes and one central stripe that delimits two dark areas. Metasternum with two yellow stripes between coxa that delimit a dark central area (Fig. 2). First urotergite: brown and with distinct transverse groove (Fig. 5A). Scutellum with a long glabrous space between pronotum and beginning of a semi-circular base that supports central depression with sensillae. Lateral edges of scutellum slightly curved and with fine apex (Fig. 6A).

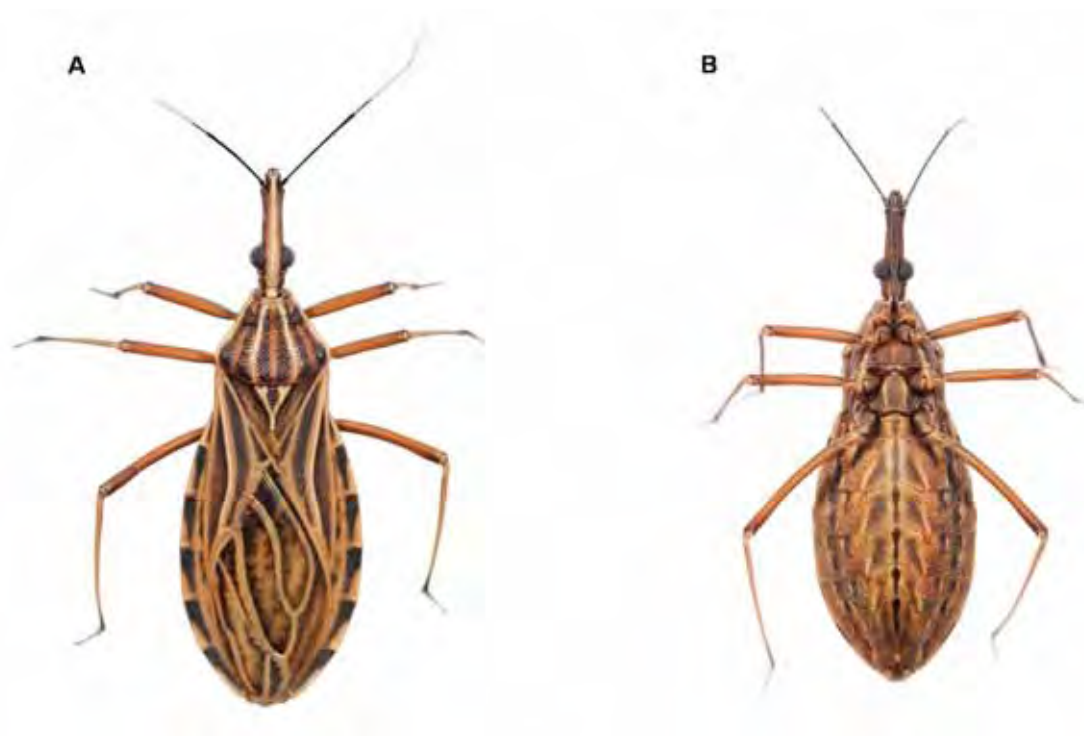


FIGURE 2. *R. montenegrensis* n. sp. female. A, dorsal side; B, ventral side.

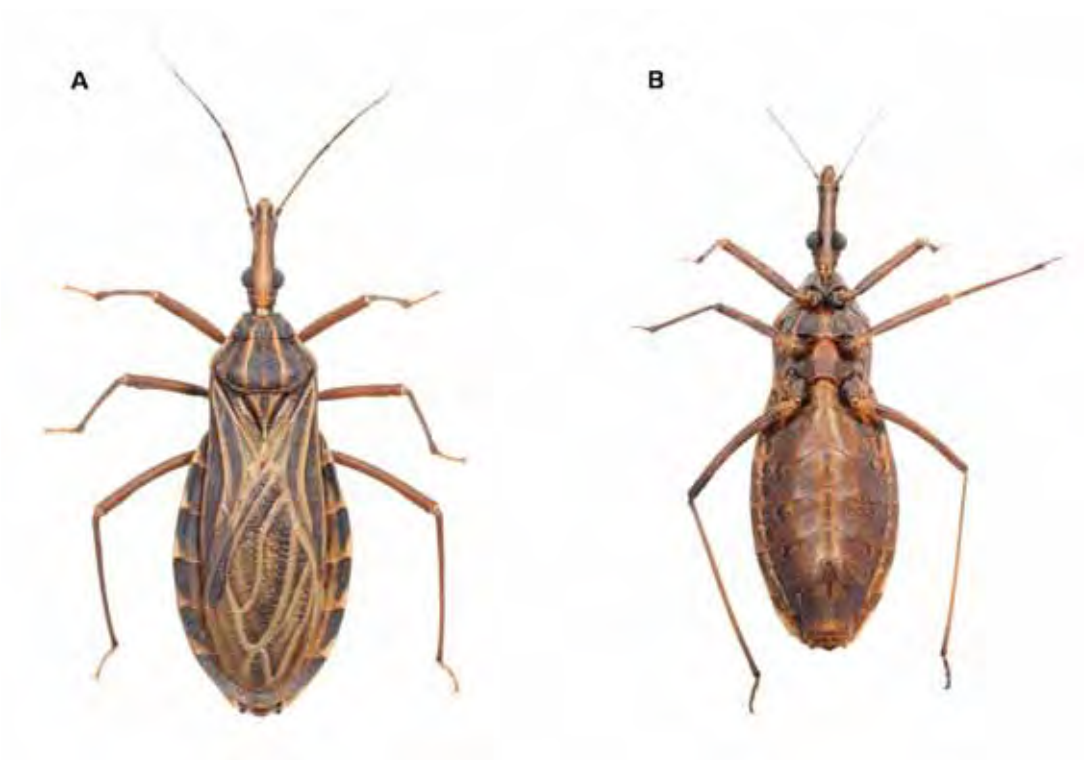


FIGURE 3. *R. robustus* female. A, dorsal side; B, ventral side.



FIGURE 4. Wing of *R. montenegrensis* n. sp. with the seven landmarks used in morphometric analysis. According to Gurgel-Gonçalves *et al.* (2008). Sc, subcosta vein.

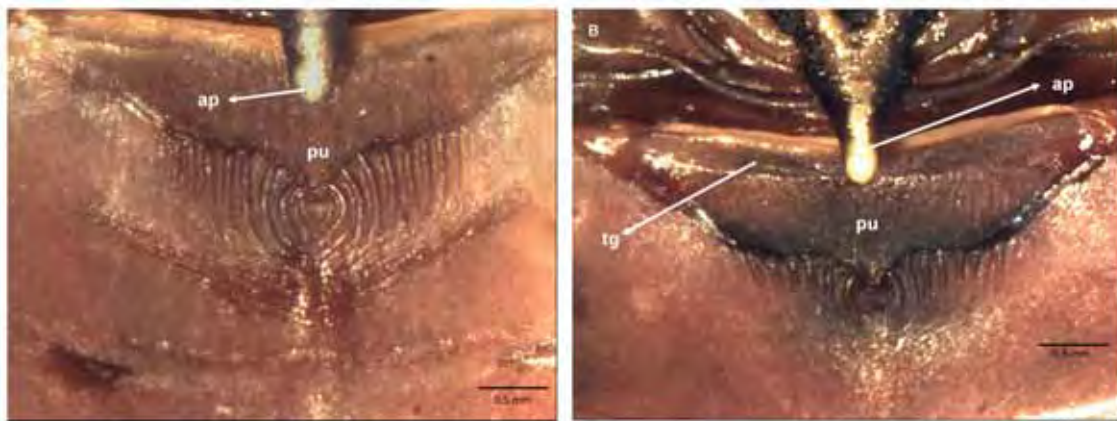


FIGURE 5. Process of the I urotergite. A, *R. montenegrensis* n. sp.; B, *R. robustus*. ap, apex of scutellum; pu, process of the I urotergite; tg, transverse groove.

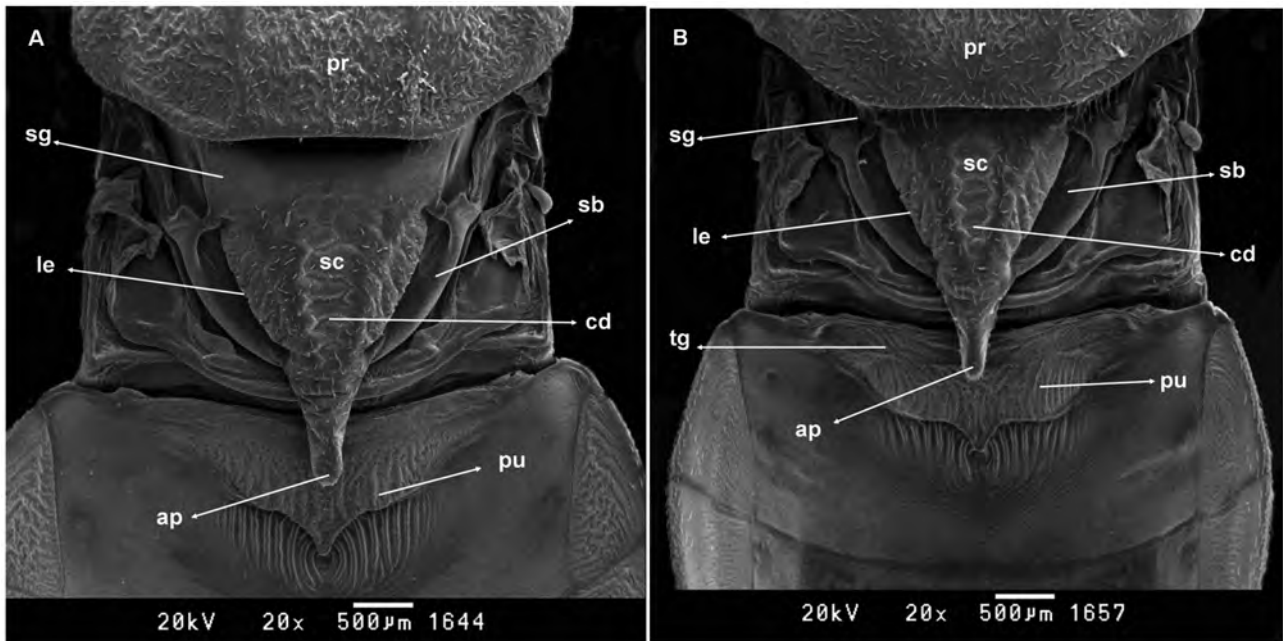


FIGURE 6. Scutellum by SEM. A, *R. montenegrensis* n. sp.; B, *R. robustus*. pr, pronotum; sc, scutellum; sb, semi-circular base; sg, glabrous space; cd, central depression; le, lateral edge; ap, apex of scutellum; pu, process of the I urotergite; tg, transverse groove.

Ventral abdomen with yellow and dark areas anteriorly to posteriorly. Dorsal connexivum with a dark spot occupying about 1/3 of each segment, wider on anterior portion, and narrowing towards posterior portion. Internal and external borders of connexivum with a noncontinuous yellow stripe. Externally yellow stripe not continuous. First abdominal segment resembling metasternum, but smaller (Fig. 2).

Median length of the basal plate (EPIb) does not involve endosomes. Basal plate (PIb) has a regular arc shape. Process of phallosoma (PrPh) is the most intensely chitinized structure of phallus, contains two cylindrical pieces with well-defined contours (Fig. 7A, B, C) Median process of the pygophore inserted in a wide triangular base surrounded by a groove-shaped cuticle, anterior 2/3 wider than the posterior 1/3, which narrows to a gross point (Fig. 8A).

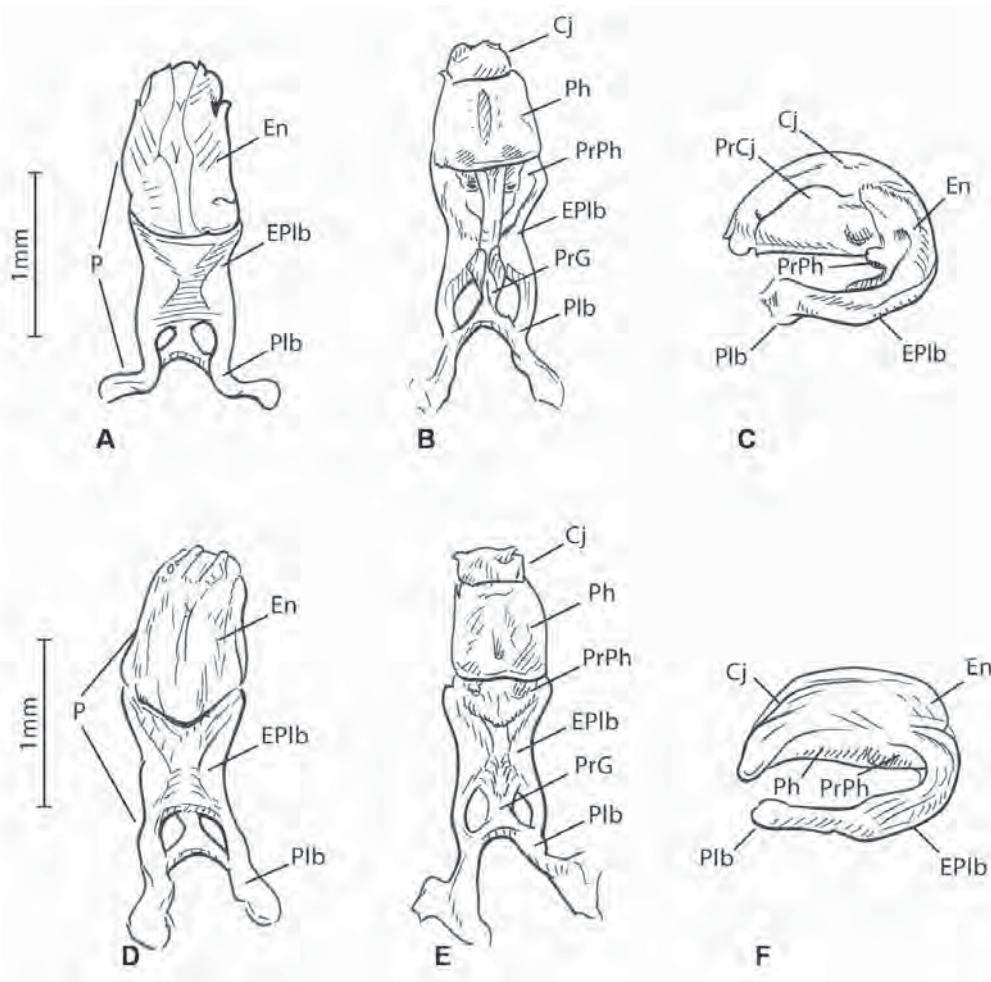


FIGURE 7. Phallus of *R. montenegrensis* n. sp. (A, dorsal view; B, ventral view; C, lateral view) and *R. robustus* (D, dorsal view; E, ventral view; F, lateral view). Cj, conjunctive; En, endosome; EPIb, median extension of basal plate; P, phallus; PIb, basal plate; PrG, gonopore process; PrPh, phallosoma process; Ph, phallosoma; PrCj, conjunctive process.

Ventral view: female external genitalia with two small lateral saliencies on 9th sternite and a circular line (Fig. 9A) on 7th sternite, which borders gonocoxites. Dorsal view: 7th tergite with a trapezoidal shape ending on two tips on posterior portion (Fig. 10A). Posterior view: female external genitalia with small 9th tergite; large opening limiting X segment with gonapophyses VIII and gonocoxites VIII (Fig. 11A).

Eggshell length 1.58 ± 0.080 mm, width 0.99 ± 0.035 mm, area 1.26 ± 0.061 mm. Egg featuring a collar, an exochorion with a grainy surface, tapered holes regularly distributed and no cell demarcation (Figs. 12A, 13A).

Classic and geometric morphometrics. Statistical analyses based on unpaired t-test show significant values ($\alpha=0.05$) for some parameters between females (HL, IE, AO, PO, DE, R1, R2, TL, MWT, MWA, A2 and A3) and between males (HL, AO, PO, DE, R2, R3, MWT, A1, A2 and A3) (Table 1).

Eggshell measurements and the statistical analyses based on unpaired t-test show significant values ($\alpha=0.0001$) for eggshell area and length, whereas the others parameters were not significant.

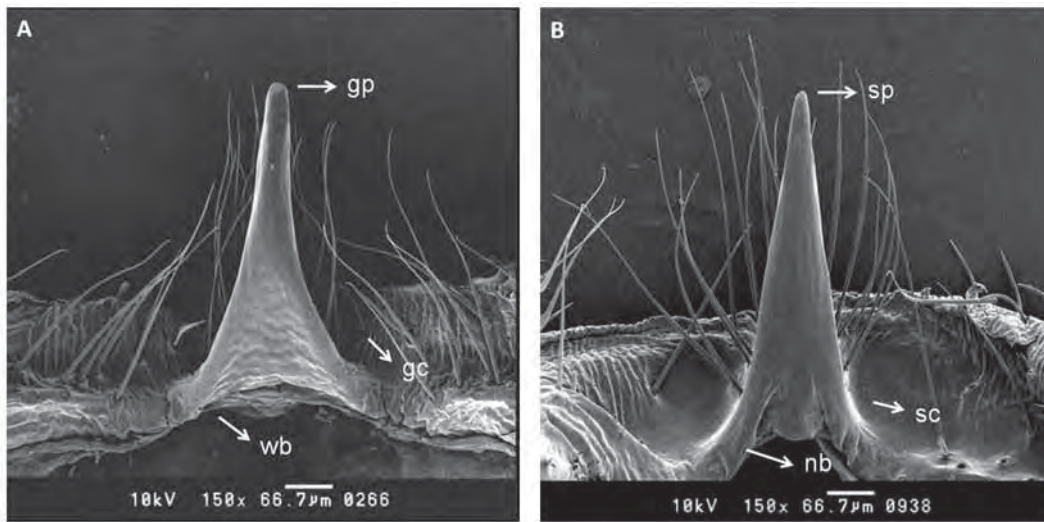


FIGURE 8. Median process of the pygophore by SEM. A, *R. montenegrensis* n. sp.; B, *R. robustus*. gc, groove cuticle; gp, gross point; nb, narrow triangular base; sc, smooth cuticle; sp, slender point; wb, wide triangular base.

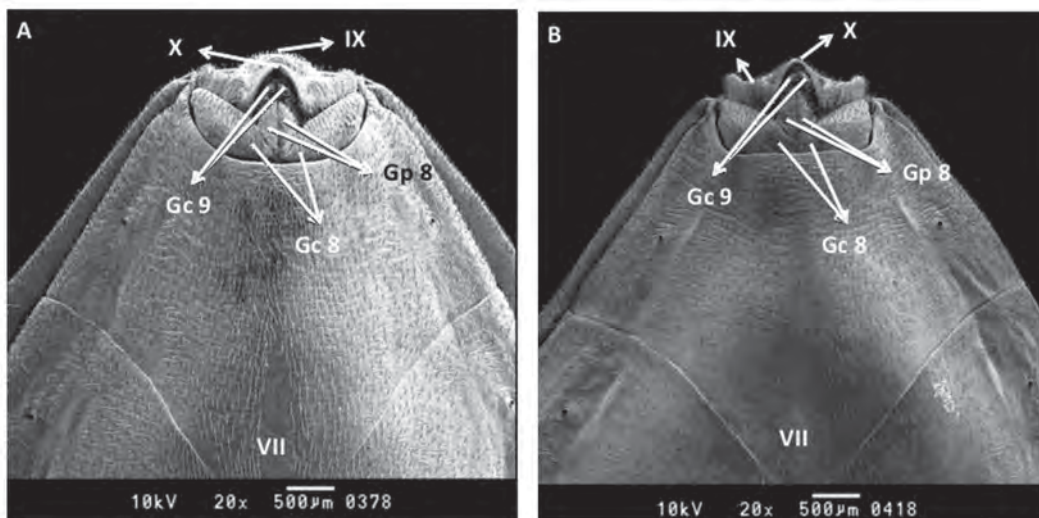


FIGURE 9. Female external genitalia by SEM, ventral side. A, *R. montenegrensis* n. sp.; B, *R. robustus*. Gc 8, gonocoxite VIII; Gc 9, gonocoxite IX; Gp 8, gonapophyse VIII; VII, IX, esternites; X, segment (Rosa *et al.* 2010).

For the geometric morphometrics the factorial map built with 18 specimens of *R. robustus* and 23 specimens of *R. montenegrensis* n. sp. distinguished both species in well-defined groups. The Mahalanobis distance between the two species was 3.85. Considering the shape variation components, the contribution of the first principal (PC1) component accounted for 39% of the total variation, whereas the second principal component (PC2) accounted for 35% (Fig. 14).

Molecular analysis. For the Bayesian analysis, the alignment of a 369pb of Cyt *b* gene was obtained, and the phylogenetic tree showed that the *R. montenegrensis* n. sp. is a sister to *R. robustus*. This tree also included other six *Rhodnius* species (*R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *R. pictipes*, *R. brethesi*). Phylogenetic reconstruction also certified the taxonomic status of insects belonging to CTA 88 (Fig. 15).

Based on this, an additional molecular methodology was applied to differentiate both species. Therefore, 5.8S/ITS-2 genes from nuclear DNA were amplified by PCR and generated a fragment of 1,200 base pairs (Marcilla *et al.* 2001). This gene were treated by restriction enzyme BstUI by PCR-RFLP (Naegele *et al.* 2006) and generated two fragments of 1,000 and 150 pair of bases for *R. robustus* and there was no digestion for *R. montenegrensis* (Fig. 16).

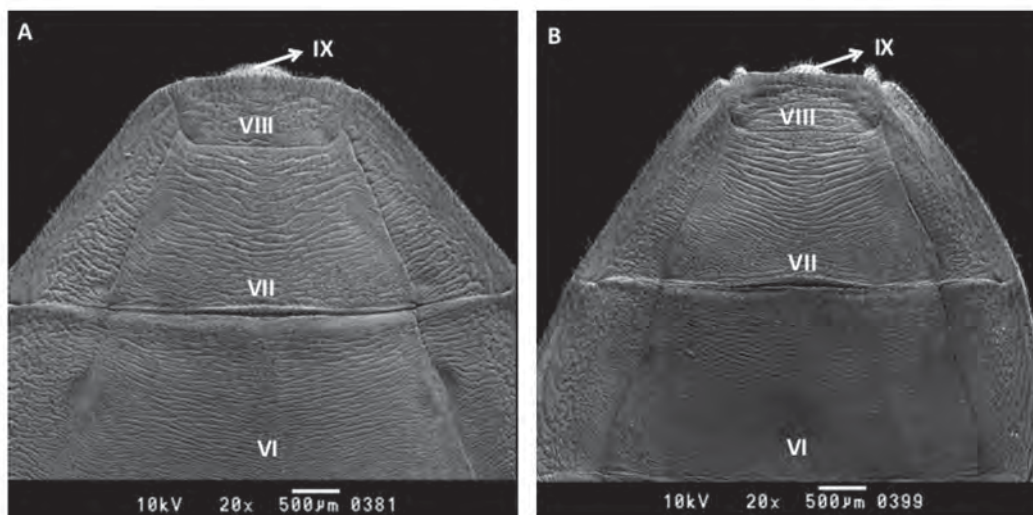


FIGURE 10. Female external genitalia by SEM, dorsal side. A, *R. montenegrensis n. sp.*; B, *R. robustus*. VI, VII, VIII, IX, tergites (Rosa *et al.* 2010).

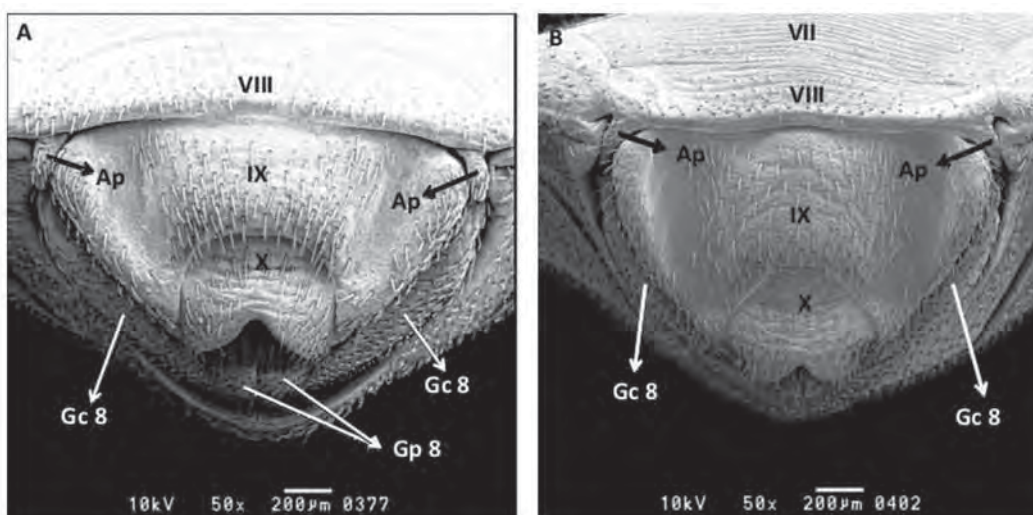


FIGURE 11. Female external genitalia by SEM, posterior side. A, *R. montenegrensis n. sp.*; B, *R. robustus*. Ap, appendices; Gc 8, gonocoxite VIII; Gp 8, gonapophyse VIII; VII, VIII, IX, tergites; X, segment (Rosa *et al.* 2010).

Discussion

Distinction between *Rhodnius* species by means of a stereoscopic microscope caused many difficulties, as it had already been reported by many authors who had studied this genus (Neiva & Pinto 1923; Valente *et al.* 2001). Nevertheless, even under a macroscopic view, it was noticed that a yellow tonality is prevailing, and reflects itself in a lighter overall color in the case of *R. montenegrensis*, while amber prevails in the case of *R. robustus* (Figs. 2, 3).

By using a stereoscopic microscope, it can be noticed that in *R. montenegrensis n. sp.* there are yellow spots interposed with dark ones over the ventral abdomen lengthwise, while in *R. robustus* such spots are not noticed (Figs. 2B, 3B). Respiratory spiracles at the ventral abdomen are surrounded by yellow in *R. robustus*, but absent in *R. montenegrensis* (Fig. 2B, 3B). *R. robustus* legs present a brown tonality and did not have a black stripe at the posterior tibial portion *R. robustus* exhibits two lateral saliencies on the 9th sternite (Fig. 3). *R. robustus* first urotergite is black and notably distinct from those exhibited by *Rhodnius montenegrensis n. sp.* (Fig. 5). These characters *per se* allow the taxonomic identification of *R. montenegrensis* without the aid of sophisticated techniques. In addition, it must be stressed that the taxonomic definition based on chromatic patterns has been widely

proposed for other species of triatomines, such as the members of the *Triatoma brasiliensis* species complex (Costa *et al.* 2006; Costa & Felix 2007) and *phyllosoma* complex (Lent and Wygodzinsky 1979; Martínez *et al.* 2006; Martínez-Ibarra *et al.* 2009), and these studies have also been strongly supported by biological and molecular approaches.

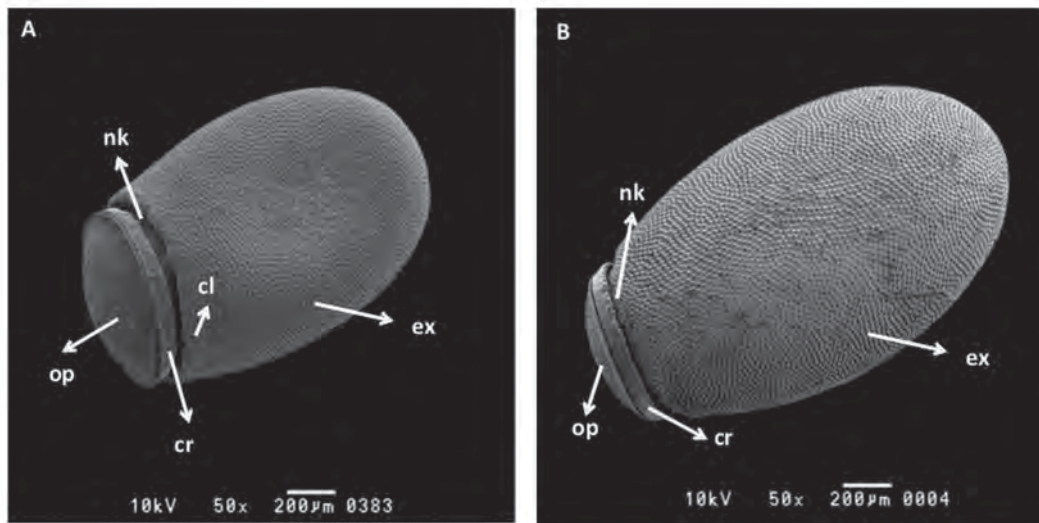


FIGURE 12. Egg general vision by scanning electron microscopy. A, *R. montenegrensis* n. sp.; B, *R. robustus*. cl, collar; cr, chorial rim; ex, exochorion; nk, neck; op, operculum (Barata 1981).

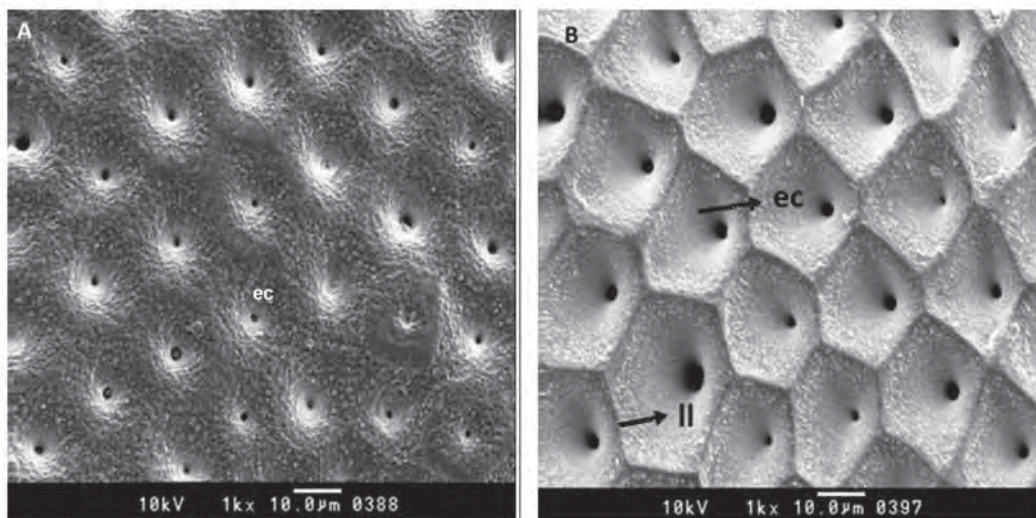


FIGURE 13. Egg exochorion detail by scanning electron microscopy. A, *R. montenegrensis* n. sp.; B, *R. robustus*. ec, exochorion cell; ll, limiting line (Barata 1981).

Using classic morphometric approaches, significant distinguishing characteristics were observed between *R. montenegrensis* n. sp. and *R. robustus*, mainly in the proboscis and antennae, but also in head and egg shape. However, the most prominent distinguishing characteristics between these two species were noticed by means of morphometry and scanning. In both males and females of *R. montenegrensis* n. sp., the total length of the second segment of the proboscis, second segment of the antennae, and interocular distance are significantly larger than in *R. robustus* (Table 1). On the other hand, length and area of eggs are significantly larger in *R. robustus* than in *R. montenegrensis* n. sp. (Fig. 12). Geometric morphometrics revealed that the shape of *R. montenegrensis* n. sp. wings was clearly different from that of *R. robustus*. The degree of shape divergence noticed in this study was greater than those observed by Márquez *et al.* (2011) among populations of *R. robustus*.

By means of scanning, it was noticed that *R. montenegrensis* n. sp. eggs bear a collar, and the exochorion cells

feature a grainy surface, tapered holes that are regularly distributed, with no cell demarcation (Fig. 12). According to Barata (1981), in *R. robustus* there is no collar, and the exochorion cells are well demarcated and tapered, each of them delimited by a central hole, mostly hexagonally shaped (Fig. 13). The most noticeable differences have also been observed by dorsal, posterior and ventral views of the female genitalia (Rosa *et al.* 2010), as well as of the median process of pygophore (Lent and León 1958; Harry 1993) and phallosoma (Figs. 7–11). Male genitalia of *R. robustus* is described in accordance with the description provided by Lent and Jurberg (1969).

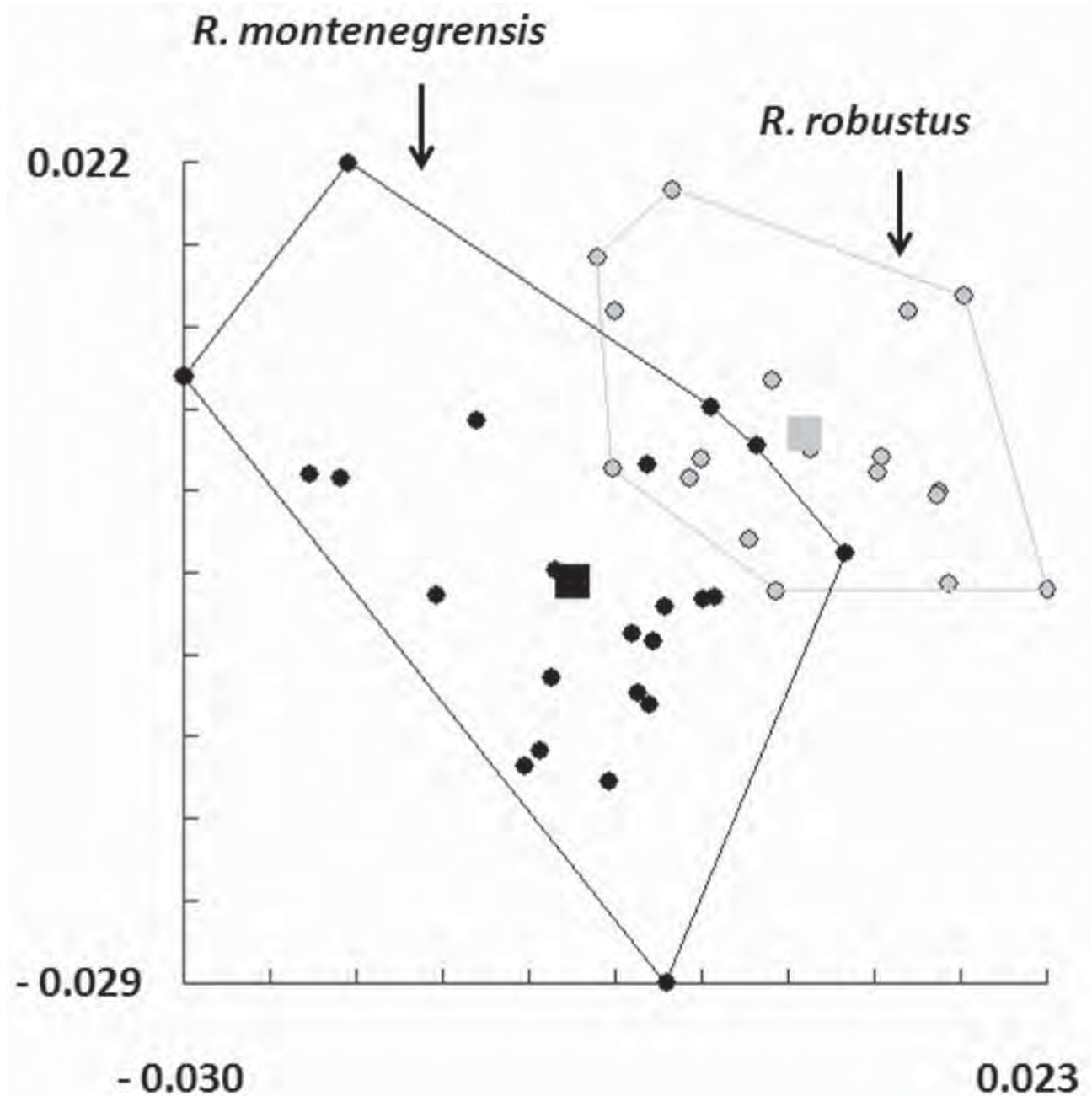


FIGURE 14. The factorial map of the wing shape for the specimens *R. robustus* and *R. montenegrensis* n. sp.

R. montenegrensis n. sp. and *R. robustus* scutellum showed three distinct features, which are detailed in Figure 6.

Phylogenetic analysis showed a close relationship between the new described species and *R. robustus* (Fig. 15). The digestion product of the 5.8S/ITS-2 genes by *Bst*UI enzyme also showed distinct profiles between them (Fig. 16). Even though molecular approaches have corroborated morphological evidences for *R. montenegrensis* n. sp. as a new species, being closely related to *R. robustus*, the dataset obtained herein stress that the morphology must be the major approach and the species under study should be carefully examined before defining a new evolu-

tionary entity. Therefore, morphology must be used for providing phenotypic information to define the species, and molecular data work as a complementary approach to support morphological findings (Schlick-Steiner *et al.* 2010).

After describing *R. montenegrensis* n. sp., 146 Triatominae species are currently acknowledged; out of which 18 belong to the genus *Rhodnius* (Jurberg *et al.* 2009; Schofield & Galvão 2009).

The “prolixus” complex comprises *R. prolixus*, *R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, and *R. nasutus* (Barrett 1991; Harry 1993; Barrett 1996; Dujardin *et al.* 1999b). *R. montenegrensis* n. sp. is clearly a new member of this species complex, and a taxonomic key for specific identification is currently being developed and will be presented with a revision based on the female genital structures.

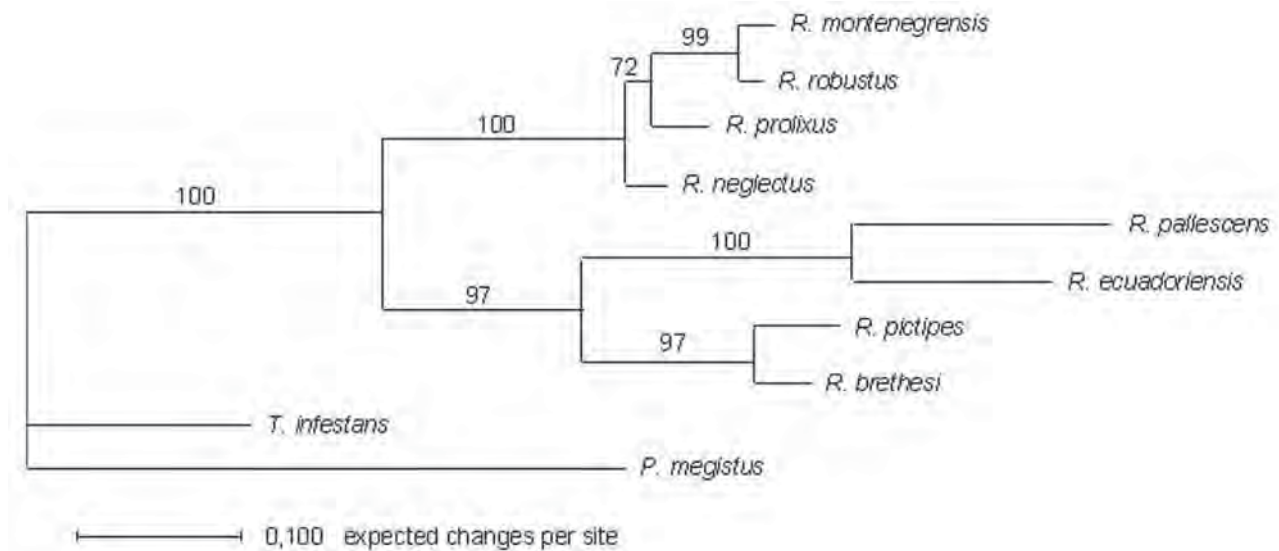


FIGURE 15. Bayesian analyze based on Likelihood parameter among seven *Rhodnius* species and *R. montenegrensis* n. sp. (CTA 088), based on Cyt *b* gene of the mtDNA sequences. *Triatoma infestans* and *P. megistus* were using by outgroup.

Summary of the main characters that distinguish *R. montenegrensis* n. sp.

Head: head length of females and males of *R. montenegrensis* n. sp. is significantly larger than that of *R. robustus*. There are also differences in other eleven characters of that portion (Table 1).

Thorax: anterior wings with well-demarcated veins, notably the Sc by a yellow tonality in *R. montenegrensis* n. sp., but not in *R. robustus* (Fig. 4). *R. montenegrensis* n. sp. exhibits yellow legs, and overall that is the insect’s color, except for a black stripe on the posterior tibial portion, at the tarsus limit. Mesosternum presents two lateral stripes and one central stripe, which delimits two dark areas. Metasternum features two yellow stripes between the medial coxa that delimits a dark area in the center (Fig. 2). *R. robustus* legs present brown color and do not exhibit a black stripe at the posterior tibial portion (Fig. 3).

Abdomen: *R. montenegrensis* presents yellow spots interposed with dark ones over the ventral abdomen lengthwise, while no such spots are noticed in *R. robustus*. Respiratory spiracles at the ventral abdomen are surrounded by yellow for *R. robustus*, differing from those of *R. montenegrensis*, which are darker. In *R. robustus* there are two lateral saliencies on the 9th sternite (Figs. 2B, 3B).

Eggs: *R. montenegrensis* n. sp. have a collar, and exochorion cells feature a grainy surface, tapered holes that are regularly distributed, with no cell demarcation (Fig. 12). In *R. robustus*, there is no collar, and the exochorion cells are well demarcated and tapered, being all of them delimited by a central hole, mostly hexagonally shaped (Fig. 13).

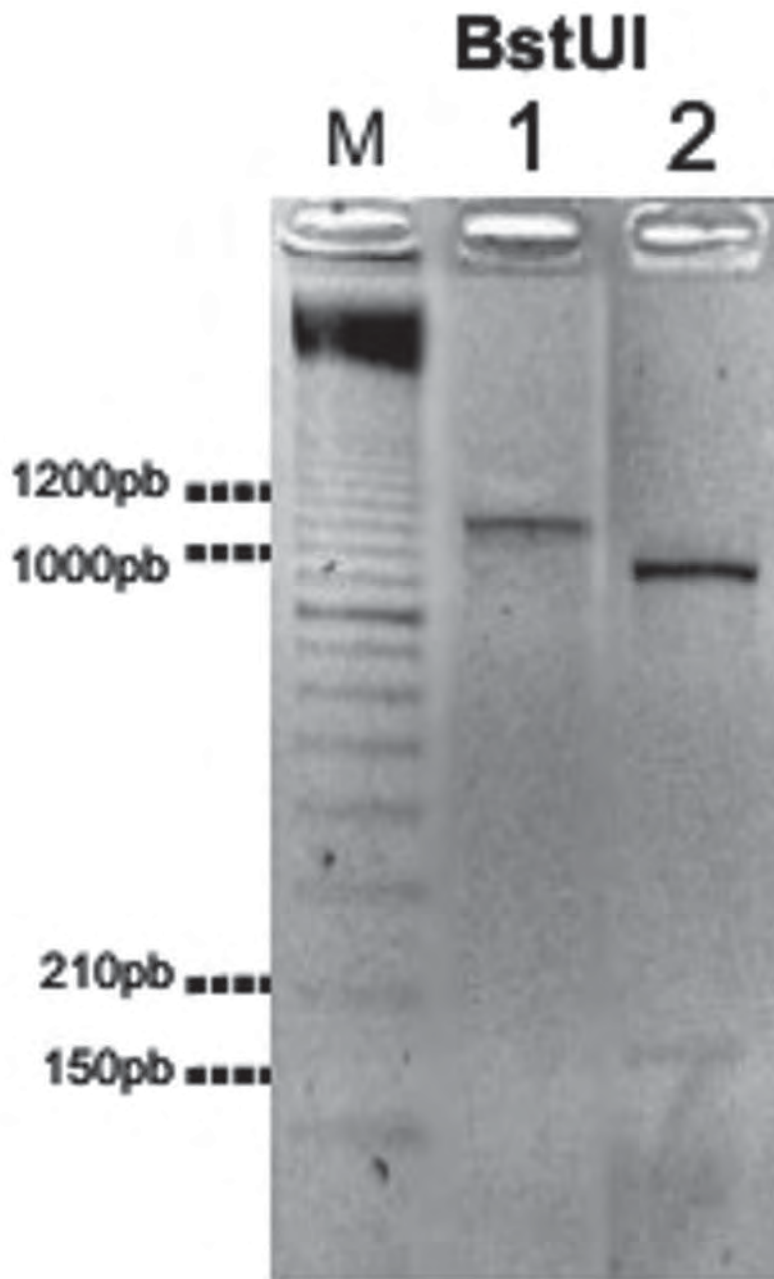


FIGURE 16. Fingerprint of the triatominae species produced by PCR-RFLP with BstUI enzyme on 2% agarose gel. M, 100bp DNA ladder marker; 1, *R. montenegrensis* n. sp.; 2, *R. robustus*.

Acknowledgments

We wish to thank Prof. Dr. Oswaldo Paulo Forattini (*in memoriam*), who founded the Triatominae Insectarium of the Public Health College (USP – São Paulo) in 1967; Prof. Dr. José Maria Soares Barata, an enthusiast of the study of triatomines who kept the Triatominae Insectarium at the Special Healthcare Service of Araraquara (SESA) from 1983 to 2008; João Luiz Molina Gil, who took care of the transference of the Triatominae colonies from SESA to the Insectarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Unesp, Araraquara, in January 2008; Dr. Marcos Obara, who encouraged the study of the new species herein described; Dr. Cleber Galvão, from Fiocruz, for his

suggestions and for providing the reference collection specimens; Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, from FCF/UNESP/Araraquara and Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues, from FMRP/USP, who provided the sequences of Cyt *b*; Sebastião Dameto, from IQ/Unesp/Araraquara, for helping us during the studies on the scanning electron microscope; Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna (FMVZ/USP—São Paulo), for his helpful suggestions and the first English version, Davi Antonio da Rosa, for the photos and drawings of figures 2, 3 and 7; and Dr. Carl Schaefer, for the careful review of this manuscript.

Financial support: Sao Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

- Almeida, C.E., Oliveira, H.L., Correia, N., Dornak, L.L., Gumiel, M., Neiva, V.L., Harry, M., Mendonça, V.J., Costa, J. & Galvão, C. (2012) Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Tropica*, 122, 71–79.
- Barata, J.M.S. (1981) Aspectos morfológicos de ovos de Triatominae II. Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde Pública*, 15, 490–542.
- Barrett, T.V. (1991) Advances in triatominae bug ecology in relation to Chagas disease. *Advances Disease Vector Research*, 8, 143–176.
- Barrett, T.V. (1996) Species interfertility and crossing experiments in triatomine systematics. In: Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae (eds Schofield CJ et al.). INDRE, Mexico City, pp. 72–77.
- Bookstein, F.L. (1991) *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge Univ. Press: New York. 435 pp.
- Campos, C., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Jaramillo, N., Panzera, F. & Solari, A. (2011) Wing shape differentiation of *Mepraia* species (Hemiptera: Reduviidae). *Infection Genetics and Evolution*, 11, 329–333.
- Chagas, C.J.R. (1909) Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159–218.
- Costa, J., Argolo, A.M. & Felix, M. (2006) Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, 1385, 47–58.
- Costa, J. & Felix, M. (2007) *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 87–90.
- Dujardin, J.P., Steindel, M., Chavez, T., Machane, M. & Schofield, C.J. (1999a) Changes in the Sexual Dimorphism of Triatominae in the Transition from Natural to Artificial Habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(4), 565–569.
- Dujardin, J.P., Chavez, T., Moreno, J.M., Machane, M., Noireau, F. & Schofield, C.J. (1999b) Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology*, 36, 653–659.
- Dujardin, J.P. (2004) *Anatomical landmarks collection (COO)*. Available from <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>. (accessed 3 june 2012).
- Dujardin, J.P. (2008) Morphometrics applied to Medical Entomology. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 875–890.
- Dujardin, J.P., Kaba, D. & Henry, A.B. (2010) The exchangeability of shape. *BMC Research Notes*, 3, 266.
- Forero, D., Weirauch, C. & Baena, M. (2004) Synonymy of the reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670, 1–12.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.S. & Jurberg, J. (2003) Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannet, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202, 1–36.
- Gurgel-Gonçalves, R., Abad-Franch, F., Ferreira, J.B.C., Santana, D.B. & Cuba, C.A.C. (2008) Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in Central Brazil? *Acta Tropica*, 107, 90–98.
- Harry, M. (1993) Use of the median process of the pygophore in the identification of *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87, 277–82.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755.
- Jurberg, J., Rocha, D.S. & Galvão, C. (2009) *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotropica*, 9 (1), 123–128.
- Lent, H., Jurberg, J. & Galvão, C. (1993) *Rhodnius stali* sp. n., afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88, 605–614.
- Lent, H. & Jurberg, J. (1969) O gênero *Rhodnius* Stal, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, 29, 487–560.
- Lent, H. & León, L.A. (1958) Notes on an interesting structure of the pygophore of *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 18 (4), 381–383.

- Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979) Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163 (3), 123–520.
- Lyman, E.D., Monteiro, F.A., Escalante, A.A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D.M., Dujardin, J.P. & Beard, C.B. (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 60, 377–386.
- Marcilla, A., Barges, M.D., Ramsey, J.M., Magallon-Gastelum, E., Salazar-Schettino, P.M., Abad-Franch, F., Dujardin, J.P., Schofield, C.J. & Mas-Coma, S. (2001) The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera-Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18, 136–142.
- Márquez, E., Jaramillo-O, N., Gómez-Palacio, A. & Dujardin, J.P. (2011) Morphometric and molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form from *R. robustus* Larousse, 1927 and *R. prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Tropica*, 120, 103–109.
- Martínez-Ibarra, J.A., Salazar-Schettino, P.M., Noguera-Torres, B., Vences, M.O., Tapia-González, J.M. & Espinoza-Gutiérrez, B. (2009) Occurrence of hybrids and laboratory evidence of fertility among three species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1125–1131.
- Martínez, F.H., Villalobos, G.C., Cevallos, A.M., Torre, P. L., Lactette, J.P., Alejandre-Aguilar, R. & Espinoza, B. (2006) Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 279–87.
- Mejía, J.M., Galvão, C. & Jurberg, J. (1999) *Rhodnius colombiensis* sp.n. da Colômbia com quadros comparativos entre as estruturas fálicas do gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, 6 (6), 601–617.
- Naegele, M.P., Barata, J.M.S., Cilense M. & Rosa, J.A. (2003) Estudo morfológico e morfométrico de pernas de ninfas de 1º e 2º estádios de *Mepraia spinolai* (Porter, 1934), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) e *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Entomologia y Vectores*, 10 (2), 223–235.
- Naegele, M.P., Costa, P.I. & Rosa, J.A. (2006) Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 353–357.
- Neiva, A. & Pinto, C. (1923) Estado actual dos conhecimentos sobre o gênero *Rhodnius* Stal, com a descrição de uma nova espécie. *Brasil-Médico*, 37, 20–24.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Nieves, Aldrey, J.L. (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, 53, 47–67.
- Obara, M.T., Rosa, J.A., Ceretti Junior, W., Urbinatti P.R., Quintero, L.O., Barata, J.M.S., Galvão, C. & Jurberg, J. (2007) A study of the scutellum in eight Chagas disease vector species from genus *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) using optical and scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (4), 463–468.
- Quintero, L.O. (2002) *Avaliação do valor sistemático do processo do I urotergito em machos de onze espécies de importância em saúde pública da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)*. Doctoral Thesis, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rosa, J.A., Barata, J.M.S., Cilense, M. & Neto, F.M.B. (1999) Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circumaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28, 363–375.
- Rosa, J.A., Justino, H.G. & Barata, J.M.S. (2003) Diferença no tamanho de cascas de ovos de colônias de *Panstrongylus megistus*. *Revista de Saúde Pública*, 37(4), 528–530.
- Rosa, J.A., Mendonça, V.J., Rocha, C.S., Gardim, S. & Cilense, M. (2010) Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 286–292.
- Rosa, J.A., Tres, D.F.A., Santos, J.L.F. & Barata, J.M.S. (2000) Estudos morfométrico dos segmentos antenais de ninfas e adultos de duas colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). *Entomologia y Vectores*, 7 (3), 255–264.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier, R.H. (2010) Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 421–38.
- Schofield, C.J. & Galvão, C. (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110, 88–100.
- Stal, C., (1859) Monographie der Gattung Conorhinus and Verwandten. *Berliner Entomologische Zeitschrift*, 3, 99–117.
- Valente, V.C., Valente, S.A.S., Carcavallo, R.U., Rocha, D.S., Galvão, C. & Jurberg, J. (2001) Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stal, do Estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, 8 (1), 65–80.