

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Júlio César Rente Ferreira Filho

ESTUDO DE SETE ESPÉCIES DE *RHODNIUS*
(HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE) POR MEIO DE DOIS
GENES NUCLEARES E UM MITOCONDRIAL.

Araraquara
2011

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Júlio César Rente Ferreira Filho

ESTUDO DE SETE ESPÉCIES DE *RHODNIUS*
(HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE) POR MEIO DE DOIS
GENES NUCLEARES E UM MITOCONDRIAL.

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP para obtenção do título de mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara
Ferreira Filho, Júlio César Rente
F383e Estudo de sete espécies de *Rhodnius* (Hemíptera, Reduviidae,
Triatominae) por meio de dois genes nucleares e um mitocondrial / Júlio
César Rente Ferreira Filho. – Araraquara, 2011
50 f.

Dissertação (Mestrado) – 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. *Rhodnius*. 2. Triatominae. 3. Gene 16S. 4. PCR-RFLP. I. Rosa, João
Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Trabalho desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara com auxílio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP), processo 01243/10-DFP.

Dedicatória:

Dedico este trabalho à minha mãe Lúcia e ao meu pai Julio César pelo constante amor e empenho na busca do meu melhor, sempre ensinando valores que levarei por toda minha vida. Impossível expressar minha gratidão por vocês.

À minha irmã Annete que junto com Rodrigo me proporcionaram a felicidade de ser titio do Rodriguinho, dedico a ele também.

Ao amigo e Professor João Aristeu da Rosa por diariamente nos dar o exemplo de uma conduta da vida humana, sempre com simplicidade e humildade.

Meus agradecimentos:

Serei eternamente grato a toda minha família: avós, pais, irmã, agora um sobrinho, tios e primos. É um prazer estar ou ter estado junto com todos vocês. Obrigado por todo respeito, carinho e apoio que tem por mim, sem vocês não seria possível;

Ao Professor João Aristeu da Rosa por ter aceitado trabalhar comigo e por sempre ter tido atenção e disponibilidade em me orientar;

Ao Professor Paulo Inácio da Costa que me recebeu como um co-orientando, dando todo suporte necessário para contribuir com minha pesquisa;

À amiga e Professora Mara Cristina Pinto, que sempre me direcionou palavras positivas. Muito atenciosa e disposta em ajudar;

Aos amigos de toda vida, Bruno Paulo de Araneda Villegas, Carlos Eduardo Vieira, Danilo Henrique Gomes Garcez, Diego de Souza, Eduardo Rodrigues da Silva, Edval Pipolli Runho, Fernando Sérgio Sonego Cardozo, Fernando Teixeira Bittar, Fernando Vergara Aiello, Gabriel Smirne, Hugo Henrique Elias, Michel dos Santos, Pedro Henrique de Melo Bacci, Pedro Gaspar Tovolli, Rafael Viola, Rafael Afonso Trostdorf Lombard, Renato Andrade e Virgínio Rubin Neto, entre tantos outros amigos que tenho em Araraquara desde as épocas de Colégio Progresso;

Aos grandes amigos que fiz na graduação de Farmácia e que agora seguimos juntos, André Yoshikane Shoshima (Xicó), Caroline Maria Marcos (Panta), Enzo Yaguinuma (Kushiro), Guilherme Torres Corrêa (Lula), Gustavo Perrela, João Carlos da Fonseca Filho (Kibe), Lucas Marra, Mariana Fonseca Paes, minha madrinha de faculdade, Marcos Fernando Rosalem Lima (Macaco) e Marcus Vinicius Derani (38), obrigado a todos pela amizade que construímos;

Aos colegas do curso de Ciências Sociais, que tive o prazer de estudar junto na Faculdade de Ciências e Letras da Unesp de Araraquara entre 2009 e 2010;

Aos pós-graduandos do laboratório de Parasitologia, Aline Rimoldi, Cláudia Solano Rocha, Júlio César Miné, Renata Tomé Alves, Sueli Gardim e Vagner José Mandonça; aos alunos de iniciação científica, Jader de Oliveira, Juliana Damielli e Larissa de Almeida; e às técnicas do laboratório Dra. Isabel Martinez, a já aposentada Maria Zenaide Tita Fernandes e a Nina, pelo convívio diário;

À pós-graduanda do laboratório de Imunologia, Carolina Maria Quinello Gomes de Faria, e aos pós-graduandos do laboratório de Micologia, Caroline Maria Marcos (Panta), Haroldo César de Oliveira e Suélen Andréia Rossi, que abriram as portas para mim, e com eles pude realizar com tranquilidade grande parte do trabalho;

Às funcionárias da limpeza Solange (Sol) e da portaria Tiana, pelo sorriso e pelo bom dia. Extremamente dedicadas e simpáticas;

Aos músicos brasileiros Cartola, Chico Buarque, Jorge Ben Jor, Os Paralamas do Sucesso, Raul Seixas, Tim Maia, Vinicius de Moraes entre tantos outros artistas que compõe a infinidade da nossa música;

À todos meu muito obrigado, sem vocês eu não teria feito esse trabalho.

ÍNDICE

Lista de Figuras, Quadros e Tabelas.....	I
Abreviaturas e Siglas.....	II
Resumo/Abstract.....	III
Introdução.....	1
Agente Etiológico.....	4
Transmissão da doença de Chagas.....	5
Manifestações Clínicas.....	7
Triatomíneos.....	8
Caracterização dos Triatomíneos.....	10
Justificativa.....	13
Objetivos.....	14
Materiais e Métodos.....	15
Espécies utilizadas no projeto.....	15
Extração do DNA genômico	19
Amplificação de DNA por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	20
Sequenciamento e análise de dados.....	22
PCR RFLP.....	24
Resultados.....	27
Extração do DNAg.....	27
Padronização das reações de PCR.....	27
Sequenciamento do gene mitocondrial 16S.....	28
Análise filogenética do gene 16S.....	31
Análise dos fragmentos gerados por PCR-RFLP.....	35
Discussão.....	40
Sequenciamento do gene mitocondrial 16S.....	40
PCR-RFLP.....	41
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas	44

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. (Pág. 4) Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos (Coura, 2010).

Figura 2. (Pág. 6) Ciclo da transmissão vetorial da doença de Chagas (disponível em OMS - <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>, acessado em 23/06/2011).

Figura 3. (Pág. 11) Esquema representativo segundo Carvalho et al. 2002 da disposição dos genes do DNA mitocondrial. O gene 16S está indicado pela seta.

Figura 4. (Pág. 26) Avaliação da qualidade das amostras de DNA genômico extraídas de triatomíneos. Eletroforese com gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Setas indicando as bandas referentes ao DNA genômico extraído. Amostras 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. nasutus* CTA 53; 3) *R. sp* CTA 88; 4) *R. neglectus* CTA 58; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6) *R. pictipes* CTA 71; 7) *R. prolixus* CTA 76; 8) *R. prolixus* CTA 79; 9) *R. robustus* CTA 85 e 10) *R. robustus* CTA 86.

Figura 5. (Pág. 26) Avaliação da qualidade das amostras de DNA genômico extraídas da amostra de *R. nasutus* CTA 211. Eletroforese com gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Figura 6. (Pág. 27) Eletroforese da amplificação do gene 16S em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM – Peso molecular 1Kb plus. Exemplos: 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. nasutus* CTA 53; 3) *R. sp* CTA 88; 4) *R. neglectus* CTA 58; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6) *R. pictipes* CTA 71; 7) *R. prolixus* CTA 76; 8) *R. prolixus* CTA 79; 9) *R. robustus* CTA 85; 10) *R. robustus* CTA 86; 11) *R. nasutus* CTA 211.

Figura 7. (Pág. 27) Eletroforese da amplificação do gene 5,8S/ITS-2 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM – Peso molecular 1Kb plus. Exemplos: 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. nasutus* CTA 53; 3) *R. sp* CTA 88; 4) *R. neglectus* CTA 58; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6) *R. pictipes* CTA 71; 7) *R. prolixus* CTA 76; 8) *R. prolixus* CTA 79; 9) *R. robustus* CTA 85; 10) *R. robustus* CTA 86; 11) *R. nasutus* CTA 211.

Figura 8. (Pág. 28) Alinhamento das seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial dos exemplares: *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86 e *R. nasutus* CTA 211.

Figura 9. (Pág. 30) Alinhamento das seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial dos exemplares: *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86 e *R. nasutus* CTA 211 junto com as seqüências obtidas do NCBI (Tabela 3).

Figura 10. (Pág. 31) Dendograma utilizando o método de Neighbor-Joining por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211.

Figura 11. (Pág. 32) Dendograma utilizando o método de Neighbor-Joining por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, junto com os obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

Figura 12. (Pág. 33) Dendograma utilizando o método de Máxima Parcimônia por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88 ; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211.

Figura 13. (Pág. 33) Dendograma utilizando o método de Máxima Parcimônia por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, junto com os obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

Figura 14. (Pág. 34) Dendograma utilizando o método de UPGMA por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 58; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86.

Figura 15. (Pág. 34) Dendograma utilizando o método de UPGMA por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, junto com os obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

Figura 16. (Pág. 35) “Fingerprint” das espécies 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. sp* CTA 88; 3) *R. neglectus* CTA 67; 4) *R. pictipes* CTA 71; 5) *R. prolixus* CTA 76; 6) *R. robustus* CTA 85 e 7) *R. nasutus* CTA 53, nessa ordem, gerados pela restrição com as enzimas BstUI, HhaI, MboI e RsaI em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. Padão de PM 100pb.

Figura 17. (Pág. 37) Dendograma construído pelo programa Multi Variate Statistical Program 3 utilizando o método UPGMA para as amostras *R. brethesi* CTA 222; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85 e *R. nasutus* CTA 53.

Figura 18. (Pág. 38) Dendograma construído utilizando-se o método UPGMA com coeficiente de Jaccard para as amostras *R. brethesi* CTA 222; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85 e *R. nasutus* CTA 53 junto com os dados das amostras de *R. domesticus* e *R. stali*, estudadas por Naegele et al. 2006.

Figura 19. (Pág. 38) “Fingerprint” das espécies 1,2) *R. brethesi* CTA 222; 3,4) *R. nasutus* CTA 53; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6,7) *R. pictipes* CTA 71; 8,9) *R. prolixus* CTA 76; 10) *R. prolixus* CTA 79; 11) *R. robustus* CTA 85; 12) *R. nasutus* CTA 211; 13,14) *R. sp* CTA 88; 15,16) *T. brasiliensis* CTA 202, CN) Controle negativo, gerados pela reação com as enzimas RsaI + HaeIII + HinfI. Em gel de agarose 2,0% corado com Nancy 520. Padrão de PM 50pb.

Figura 20. (Pág 39) Gel de agarose 2% corado com Nancy 520, padrão de peso molecular de . Amostras 1) *R. prolixus* CTA 79, 2) *R. neglectus* CTA 57 e 3) *R. robustus* CTA 85. a) produto da reação com as enzimas HinfI + HaeIII + RsaI, b) HinfI + HaeIII, c) Mbol + HaeIII, d) Moll + HinfI.

Figura 20. (Pág. 39) Avaliação da combinação de enzimas a) produto da reação com as enzimas HinfI + HaeIII + RsaI, b) HinfI + HaeIII, c) Mbol + HaeIII, d) Moll + HinfI em gel de agarose 2% corado com Nancy 520 para diferenciação das amostras 1) *R. prolixus* CTA 79, 2) *R. neglectus* CTA 57 e 3) *R. robustus* CTA 85.

Quadro 1. (Pág. 24) Quadro com a combinação de enzimas utilizadas e as amostras em que foram aplicadas.

Quadro 2. (Pág. 36) Fragmentos gerados pela digestão do gene 5,8S/ITS-2 com enzimas de restrição por meio da técnica de PCR-RFLP. Visualizados em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio, comparados com padrão de PM de 100pb.

Quadro 3. (Pág. 39) Fragmentos gerados pela digestão do produto de amplificação do gene 5,8S/ITS-2 com combinação de enzimas de restrição por meio da técnica de PCR-RFLP. Visualizados em gel de agarose 2,0%, comparados com padrão de PM de 100pb.

Tabela 1. (Pág. 15) Espécies de *Rhodnius* e respectivas colônias estudadas segundo procedência, número de registro de colônias de triatomíneos de Araraquara (CTA) e data de chegada ao laboratório.

Tabela 2. (Pág. 21) Primers utilizados para amplificação dos genes 16S mitocondrial e 5,8S/ITS-2 ribossomal.

Tabela 3. (Pág. 23) Código de acesso aos fragmentos de gene 16S de uma espécie de *Panstrongylus*, onze de *Rhodnius* e duas de *Triatoma*, obtidos junto ao “National Center of Biotechnology Information” – NCBI.

Tabela 4. (Pág. 24) Enzimas utilizadas para distinção das espécies de *Rhodnius*.

Tabela 5. (Pág. 25) Volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de RFLP.

Tabela 6. (Pág. 29) Sítios variáveis encontrados nos 380pb do sequenciamento do gene 16S para as sete espécies e nove haplótipos de espécies de *Rhodnius*.

Tabela 7. (Pág. 36) Matriz binária da restrição da região 5,8S/ITS-2 utilizando as enzimas BstUI, HhaI, RsaI e MboI.

Tabela 8. (Pág. 37) Coeficiente de similaridade entre as espécies, gerado pelo programa Multi Variate Statistical Package 3.1.

Lista de abreviaturas e siglas

°C: Graus Celsius

Cyt B: citocromo B

dNTP: Trifosfato de oxinucleotídeo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ETS: espaçador externo transcrito

g: força da gravidade

DNAg: DNA genômico

ITS: espaçador interno transcrito

Kb: Kilobase (1000 pares de bases)

M: molar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

mL: mililitro

mM: milimolar

mtDNA: DNA mitocondrial

µL: microlitro

µM: micromolar

ng: nanograma

nm: nanômetro

pb: pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PM: Marcador de peso molecular

qsp: quantidade suficiente para

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

UV: luz ultravioleta

UPGMA: *Unweighted pair group method with avering*

V: Volts

WHO: World Health Organization

Resumo:

Os membros da subfamília Triatominae são vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Eles compreendem 144 espécies agrupadas em 18 gêneros e são encontrados principalmente nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile.

Essencialmente a identificação desses insetos tem sido baseada na descrição comparativa da morfologia de indivíduos adultos incluindo as estruturas da genitália masculina e feminina, aspectos gerais do corpo como cabeça, tórax, antena e coloração, entre outros. Entretanto a distinção por critérios morfológicos apresenta limitações para caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* devido à semelhança entre elas, especialmente entre *R. prolixus*, *R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, and *R. nasutus*, espécies conhecidas como “grupo prolixus”. Nesse estudo as técnicas de biologia molecular, sequenciamento do gene 16S e PCR-RFLP, foram utilizados para caracterização de sete espécies de *Rhodnius*.

Os produtos do sequenciamento do gene 16S das espécies *R. brethesi*; *R. nasutus*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. pictipes*; *R. prolixus*, *R. robustus*, e *R. sp* geraram alinhamento de 380 pares de bases com 48 sítios polimórficos. A visualização das bandas geradas pelas enzimas de restrição BstUI, HhaI, RsaI and MboI com as sete amostras de *Rhodnius* possibilitou distingui-las com exceção de *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*. Os dois métodos feitos para as mesmas amostras confirmaram a validade da utilização do método PCR-RFLP para identificação de *R. brethesi*, *R. nasutus*, *R. pictipes* e *R. sp*, uma vez que o gene 16S já é um marcador estabelecido para as espécies de *Rhodnius* e as duas metodologias apresentaram os mesmos resultados, confirmaram também o trabalho realizado por Naegele et al. 2006 em que a técnica de PCR-RFLP distinguiu *R. stale*, *R. pictipes*, *R. Prolixus* and *R. domesticus*.

Abstract:

The members of the subfamily Triatominae are vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is the etiologic agent of Chagas disease. They consist of 144 species grouped into 18 genera and are found mainly in the Americas, from the southern United States to southern Argentina and Chile.

Essentially, the identification of these insects has been based on the comparative description of the morphology of adult specimens, including the structures of both the male and female genitalia, general body features like head, thorax, antennae and color, among others. However, this method is not particularly useful in the characterization of species belonging to the genus *Rhodnius* because they are very similar morphologically, specially *R. prolixus*, *R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, and *R. nasutus*, which are known as “prolixus complex”. In this study molecular biology techniques, such as sequencing of 16S gene and PCR-RFLP, was used to contribute to the characterization of seven species of *Rhodnius*.

The products of the sequencing of the 16S species *R. brethesi*; *R. nasutus*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. pictipes*; *R. prolixus*, *R. robustus*, and *R. sp* generated a alignment of 380bp with 48 polymorphic sites. The visualization of the bands arising from the use of restriction enzymes BstUI, HhaI, RsaI and Mbol with samples of seven species of *Rhodnius* possible to distinguish them except for *R. prolixus*, *R. neglectus* and *R.robustus*. The two methods performed in parallel for the same samples confirmed the validity of using the enzymatic method for specific identification of *R. brethesi*, *R. nasutus*, *R. pictipes* e *R. sp*, since the 16S gene is already an established marker for it and the two methods showed the same results, confirmed too the work performed by Naegele et al.2006 that the PCR-RFLP technic distinguished *R. stale*, *R. pictipes*, *R. Prolixus* and *R. domesticus*.

Introdução:

Doenças tropicais são características por proliferarem em condições climáticas quentes e úmidas, são doenças infecciosas que ocorrem especialmente entre os trópicos (Camargo, 2008). O clima brasileiro foi determinante para a manutenção dessas moléstias desde a colonização dos europeus e a vinda dos africanos (Boulos, 1990). Dengue, doença de Chagas, esquistossomose, filariose, leishmaniose, malária e oncocercose, são alguns exemplos, e suas ocorrências podem estar diretamente associadas a hábitos de higiene da população e saneamento básico (Camargo, 2008).

A tripanossomíase americana, descrita em 1909 por Carlos Chagas (Chagas, 1909), foi posteriormente chamada de doença de Chagas por Miguel Couto em 1910 (Touto, 2006). O processo da descrição dessa doença foi histórico para medicina tropical brasileira. Na ocasião foram relatados a nova espécie de parasita humano, o agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, o vetor do protozoário *Panstrongylus megistus* (Coura, 2009), os hospedeiros vertebrados e as manifestações clínicas, fechando assim toda a cadeia epidemiológica dessa antropozoonose (Chagas, 1909).

Existem três ciclos pelos quais o protozoário *Trypanosoma cruzi* se mantém na natureza: ciclo silvestre, peridomiciliar e domiciliar. No ambiente silvestre os triatomíneos, vetores da doença, são encontrados em palmeiras, tocas de animais, ocos de árvores, fendas embaixo de rochas, locas de pedras, ninhos de aves, bromélias, entre outros (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Atualmente são admitidas cerca de 150 espécies de mamíferos infectados por *T. cruzi*, dentre elas, roedores, marsupiais, carnívoros, quirópteros e primatas (WHO, 2007). Pelo fato de *T. cruzi* ter grande diversidade de hospedeiros vertebrados, a doença de Chagas é uma antropozoonose complexa e sua erradicação está praticamente fora de cogitação, ficando a cargo do ser humano interromper ou evitar sua transmissão (Lewinsohn, 2005).

No momento em que o homem iniciou ações de desflorestamento das matas, destruiu o espaço natural com os ecótopos e animais que servem de fonte alimentar para os triatomíneos, rompendo o equilíbrio do ciclo silvestre e forçando os vetores a procurar novas fontes de sobrevivência. Nesse contexto os triatomíneos se aproximaram do peridomicílio e domicílio humano entrando em contato com o homem (Argolo et al., 2008). Peridomicílio é compreendido como as adjacências das casas onde vivem animais de criação ou mesmo os domésticos, que podem servir de fonte alimentar para os vetores da doença (Staindel, 2008).

A susceptibilidade do homem e animais domésticos ao *T. cruzi*, e a proliferação de triatomíneos nas habitações humanas propiciaram a disseminação do parasita ao ser humano, passando o ciclo doméstico a ter importância fundamental na transmissão da infecção chagásica (Barreto, 1967).

Segundo Coura e Dias (2009) o controle da doença de Chagas deve ser feito pela interrupção da transmissão por vetores e por transfusão sanguínea, por melhorias na qualidade das casas e região peridomiciliar, promoção da educação sanitária e pelo tratamento dos infectados na fase aguda da doença.

Até a década de 90, a fim de eliminar o vetor dos domicílios, foi utilizado o inseticida BHC (Benzeno-Hexa-Clorado), mas por ser altamente tóxico para os humanos e animais domésticos foi substituído por inseticidas piretróides (deltametrina, alfacipermetrina, betacipermetrina e outros), menos tóxicos e com maior efeito residual (Marcondes, 2001). O uso desses inseticidas no combate ao vetor possibilitou grande diminuição da infestação domiciliar por triatomíneos (Dias et al., 2002).

Na década de 80 o Brasil, juntamente com a Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai, criaram uma intensiva campanha de combate à transmissão da doença de Chagas chamada Iniciativa Cone Sul (*Southern Cone Initiative*), que contou com apoio da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (Dias, 2007b). Com ela foram promovidas

ações de borrifação de inseticidas nas casas a fim de eliminar o vetor *Triatoma infestans*, espécie mais bem adaptada às moradias humanas e altamente capaz de transmitir *T. cruzi* ao ser humano. Na mesma campanha, os países endêmicos com exceção da Colômbia, passaram a realizar exames sorológicos para diagnóstico laboratorial da doença de Chagas nos bancos de sangue e no acompanhamento pré-natal das gestantes, a fim de evitar a transmissão transfusional e congênita (Dias, 2007b).

Obtiveram como resultado dessa campanha a erradicação da infestação domiciliar por *T. infestans* e controle da transmissão via transfusão sanguínea e congênita, reduzindo fortemente o número de infecções agudas para essa moléstia (Dias, 2007b).

Até os anos 70 cerca de 20 milhões de brasileiros estavam infectados por *T. cruzi* e até 1980 havia pelo menos 120 mil casos novos da doença por ano (Camargo, 2008). A doença de Chagas hoje representa ameaça para aproximadamente 28 milhões de pessoas entre o norte do México e sul da Argentina e Chile (WHO, 2007) e existem cerca de 10 milhões de infectados nos países da América Latina (WHO, 2010).

Atualmente, em países não endêmicos a doença de Chagas é um novo desafio. Com significativa população de estrangeiros oriundos dos países latino americanos, o parasito *T. cruzi* pode viajar com a população infectada dos países endêmicos para os não endêmicos. Esse movimento tem iniciado novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos em todo o mundo (Coura, 2010).

Estima-se que existem cerca de 300 mil indivíduos infectados com *T. cruzi* nos Estados Unidos, 5 500 no Canadá, mais de 80 mil da Europa, 3 000 no Japão e 1 500 na Austrália (Figura 1). Com a ausência de vetores nesses países, as principais formas de transmissão da doença são via transfusão sanguínea e congênita, mas também existem as possibilidades de transmissão por meio de transplante de órgãos e acidentes de laboratoriais (Coura, 2010).

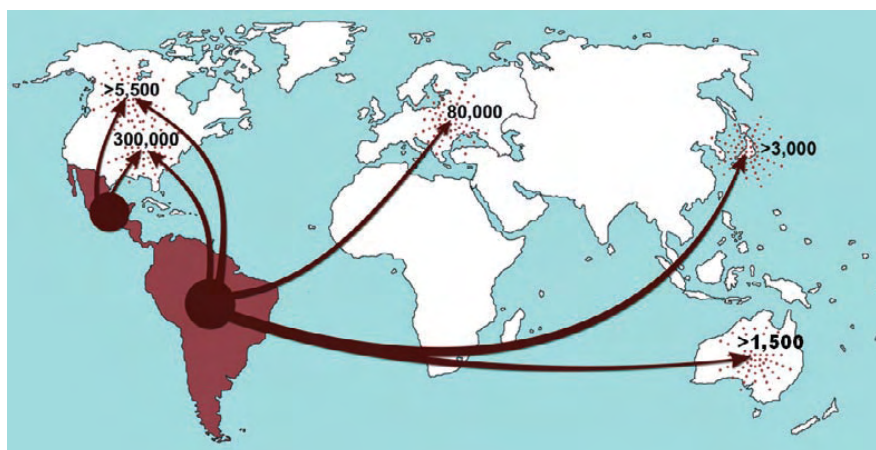


Figura 1. Rotas de migração da América Latina e estimação do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos (Coura, 2010).

Ainda hoje, mais de 100 anos após a descrição da doença de Chagas, lamenta-se a ausência de elucidação sobre a etiopatogenia, ou seja, como o parasito causa lesão no organismo, a não existência de diagnóstico sorológico totalmente fiel e a falta de um tratamento contra o agente patológico dos pacientes infectados na fase crônica da doença (Amato Neto, 2009).

Mesmo com os avanços no controle da doença nos países endêmicos, ela mantém-se como um processo mórbido relevante na saúde pública, por isso é importante garantir ações que promovam o enfrentamento tanto do agente etiológico quanto do inseto transmissor (Dias, 2007a).

Agente etiológico:

O agente etiológico *T. cruzi* é um protozoário eucarioto pertencente à ordem Kinetoplastida, que se apresenta sob as formas tripomastigota, epimastigota e amastigota. O parasito pode ser caracterizado por meio de marcadores moleculares em linhagem TcI relacionada aos isolados do ambiente silvestre ou TcII, ambiente doméstico (Souto et al., 1996; Andrade e Magalhães, 1997). Posteriormente houve uma subdivisão da linhagem TcII em cinco subgrupos de TcIIa a TcIIe (Brisse et al., 2000), e recentemente cada subgrupo passou a ser classificado como um grupo diferente, de TcI a TcVI (Zingales et al., 2009).

Transmissão da doença de Chagas:

A infecção de seres humanos e outros vertebrados silvestres ocorrem prioritariamente pelo contato da pele ou mucosa dos hospedeiros com as fezes dos triatomíneos contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (Rassi Jr. et al., 2010). As aves, répteis e anfíbios são refratários ao parasito, no entanto, servem como fonte alimentar para os triatomíneos (Noireau et al., 2009). A transmissão vetorial ainda pode representar mais de 70% dos casos nos países que não possuem sistema de controle vetorial como a Bolívia (Coura, 2010).

Na corrente sanguínea do organismo humano as formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* penetram principalmente em células do tecido cardíaco e do trato intestinal, e também são fagocitadas por macrófagos, células de defesa do sistema imune. No espaço intracelular assumem a forma amastigota que se multiplicam até o rompimento da célula parasitada. Liberadas na corrente sanguínea as amastigotas passam a ser tripomastigotas que podem penetrar novamente em outras células do tecido provocando lesão ao organismo (Argolo et al., 2008)

Os triatomíneos se infectam com *T. cruzi* ao ingerir a forma tripomastigota do sangue de mamíferos no momento do repasto sanguíneo. No intestino dos vetores as formas tripomastigotas passam a ser epimastigotas, forma de reprodução. Depois saem pelas fezes novamente na forma de tripomastigota metacíclico e são capazes de infectar outros organismos (Figura 2) (Argolo et al., 2008; Noireau et al., 2009).

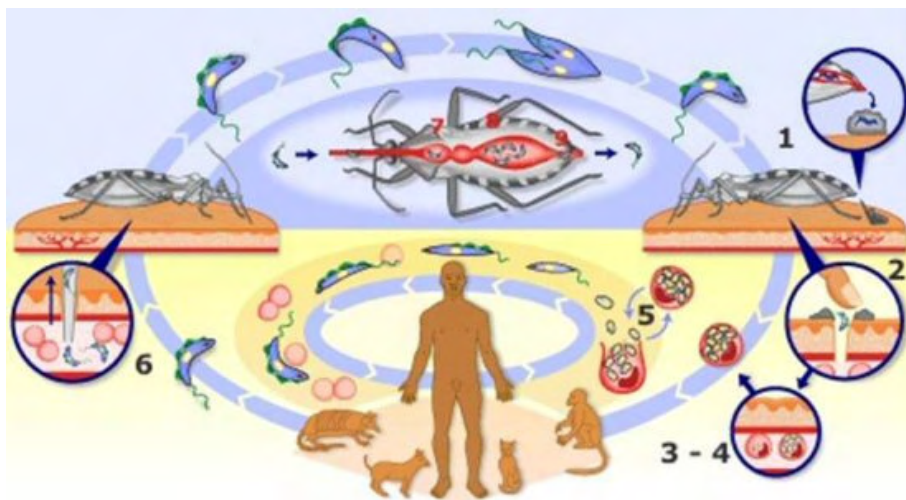


Figura 2. Ciclo da transmissão vetorial da doença de Chagas (disponível em OMS - <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>, acessado em 23/06/2011).

Existem outras formas de transmissão da doença de Chagas: via transfusão sanguínea, oral, congênita, acidentes laboratoriais e por meio de transplante de órgãos (Rassi Jr et al., 2010).

A progressiva urbanização da população rural principalmente a partir da década de 1940 introduziu o novo risco de transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea (Dias e Schofield, 1998). Em 1960 estima-se que ocorreram cerca de 6 000 a 10 000 casos de doença de Chagas transmitidos por transfusão sanguínea nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo respectivamente (Coura, 2010).

Essa via de transmissão só veio a sofrer significativo decréscimo após a década de 1980 quando se acirrou o controle sorológico das bolsas de sangue devido ao advento da AIDS (Dias, 1998; 2002; Dias e Schofield, 1998), no entanto pode significar mais de 20% dos casos em lugares onde não existe esse controle (Coura, 2010). Estudo realizado no banco de sangue da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista do município de Araraquara-SP revelou que 0,04% das bolsas de sangue, entre as 49541 doadas, apresentaram resultado positivo para doença de Chagas entre 2004 e 2008 (Ferreira-Filho, 2010). Atualmente, com o grande aumento da imigração da população de origem em regiões

endêmicas, a transmissão transfusional ganha destaque nos países não endêmicos para doença de Chagas, ocasionando um novo quadro para saúde pública desses países (Schmunis, 2007).

A transmissão congênita diminuiu com os programas de controle sorológico de mães e recém-nascidos promovidos pela Iniciativa do Cone Sul realizadas nos países endêmicos na década de 80 (Dias, 2007b), mas ainda apresenta variação entre 0,5 a 10% dos casos de transmissão em regiões do Chile, Bolívia e Paraguai (Coura, 2010).

A transmissão por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* provenientes das fezes de triatomíneos infectados (Lewinsohn, 2005). Segundo Dias (2006) a grande maioria dos casos estudados, trata-se de episódios súbitos e inesperados, ocorrendo em pequenos e limitados surtos, envolvendo entre três e dezesseis pessoas. Embora a transmissão oral seja acidental, dados atuais podem considerar que é uma forma de transmissão endêmica na região da Amazônia (Fraiha et al. 1995, Valente et al. 1999, Junqueira et al. 2005, Pinto et al. 2008).

Em 2005 ocorreu um surto de doença de Chagas agudo em Navegantes no estado de Santa Catarina, onde 24 pessoas se infectaram pela ingestão de caldo de cana, dessas, três vieram a óbito. Nessa ocasião, a mesma linhagem de *T. cruzi* foi isolada do sangue dos pacientes infectados, do vetor *Triatoma tibiamaculata* e dos hospedeiros silvestres, gambás das espécies *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*, presentes na mata próxima ao local da infecção (Steindel, 2008).

Manifestações Clínicas:

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda inicial com parasitemia evidente em exame de sangue direto, que representa mortalidade para menos de 5% entre os infectados (Brener, 2000). Entre 90 e 98% dos casos são assintomáticos. De 2% a 10% podem apresentar os sintomas, como processo inflamatório no local da infecção, chamado chagoma de

inoculação ou sinal de Romanã, febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos severos (Coura, 2009).

Na forma crônica da doença, de 50 a 69% dos infectados apresentam-se na forma latente ou indeterminada, assintomática por cerca de cinco a quinze anos, mas com diagnóstico sorológico positivo (Dias e Macedo, 2005 e Coura, 2007).

A fase indeterminada da doença de Chagas pode evoluir para a forma cardíaca, digestiva, com as manifestações clínicas de megaesôfago e megacólon, nervosa ou mista. A mais significativa manifestação clínica da doença é a cardíaca que acomete cerca de 13% dos pacientes, seguida da forma digestiva com 10% e mista 8% (Brener, 2000).

Triatomíneos:

Os triatomíneos são conhecidos desde o século XVI (Lent and Wygodzinsky, 1979), sendo a primeira espécie descrita, *Cimex rubro-fasciatus* De Geer, 1773, posteriormente chamada de *Triatoma rubrofasciata* de acordo com Galvão et al, 2003.

São pertencentes ao filo Arthropoda, animais com corpo e pernas segmentados, tais como aranhas, carrapatos; classe Insecta, com corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, apresentando sempre três pares de pernas articuladas e um par de antenas; subclasse Pterygota, insetos que apresentam asas; ordem Hemiptera, percevejos em geral que apresentam cabeça com rostro trissegmentado, dois pares de asas, sendo as anteriores metade coriáceas e metade membranosas (hemiélitros) e as posteriores inteiramente membranosas; família Reduviidae, característica pelo sulco estridulatório central e subfamília Triatominae, característico por ter rostro longo e reto, alcançando o primeiro par de pernas (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Os triatomíneos nascem de um ovo e se tornam adultos após passarem por cinco estádios ninfais, são popularmente chamados de barbeiros por geralmente picarem a face, área mais exposta principalmente durante o sono. Seus nomes vulgares variam por região:

chupões, procotós (sertão da Paraíba), vum-vum (Bahia), chupança (Mato Grosso), vinchucas (países andinos), chincha voladora (México), kissing bugs (Estados Unidos) (Argolo et al., 2008).

São representados por 144 espécies, agrupadas em 18 gêneros (Galvão et al., 2003; Forero et al., 2004; Poinar, 2005; Costa et al., 2006; Galvão & Angulo, 2006; Costa & Felix, 2007; Sandoval et al., 2007; Bérenger & Blanchet, 2007; Martinez et al., 2007, Jurberg et al., 2009), encontrados principalmente nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile (Schofield and Galvão, 2009).

Todas as espécies são potencialmente transmissoras de *T. cruzi*, embora algumas sejam mais capacitadas em transmitir o parasito ao homem, caso de *Triatoma infestans* que possui excelente adaptação às casas (Dias, 2007b). Nesse sentido, possuem maior significância epidemiológica as espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Schofield e Galvão, 2009). O gênero *Panstrongylus* conta com 14 espécies descritas (Galvão, 2003; Bérenger & Blanchet, 2007), e o gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 80 espécies (Schofield e Galvão, 2009).

As espécies do gênero *Rhodnius* colocam seus ovos aderidos ao substrato, o que favorece sua dispersão passiva e ativa, pois muitas aves formam ninhos em palmeiras e tem hábitos migratórios (Abadh Franch, 2009). Esse gênero conta com 17 espécies descritas, a maioria com hábitos silvestres vivendo em palmeiras e em ninho de pássaros, entretanto algumas colonizam moradias rurais, como *Rhodnius prolixus*, o principal vetor da doença de Chagas para humanos na América do Sul, e provavelmente o mais disperso entre os países endêmicos depois da eliminação de *T. infestans* doméstico (Abadh Franch, 2009). *Rhodnius prolixus* possui acentuada antropofilia, rápido desenvolvimento, intensa dispersão passiva, capacidade de defecar logo após alimentar-se, e grande susceptibilidade de albergar *T. cruzi* (Brener, 2000; Galvão et al., 2003; Monteiro et al., 2003; Jurberg et al., 2009).

Caracterização dos triatomíneos:

A identificação dos triatomíneos tem se pautado fundamentalmente na descrição comparativa de caracteres morfológicos de exemplares adultos (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão & Angulo, 2006), entre eles, as estruturas da genitália masculina (Lent e Jurberg, 1969; Harry, 1993; Jurberg et al., 1998), genitália feminina (Rosa et al., 2010), aspectos morfológicos gerais do corpo, cabeça, tórax, antenas, coloração, entre outros, como utilizado por Lent & Wygodzinsky em 1979 para definição específica de 111 espécies de triatomíneos.

Embora os critérios morfológicos sejam os principais mecanismos de distinção entre as espécies, essa caracterização para o gênero *Rhodnius* apresenta grande dificuldade devido às semelhanças morfológicas, particularmente entre *R. prolixus*, *R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, e *R. nasutus* espécies conhecidas como “Complexo prolixus” (Barrett, 1988, Soares, 1999, Monteiro et al., 2000). Dada às limitações de classificação morfológica, métodos de biologia molecular, bioquímicos e citogenéticos têm sido empregados na taxonomia de estudos sistemáticos dos triatomíneos (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

Existem algumas técnicas disponíveis, tais como AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) (Gaser et al., 1996), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (Hemza et al. 2009), ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analyses*) (Ventura et al., 2001), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Naegele et. al., 2006), Microsatélites (Anderson, 2002; Harry et al., 1998), seqüenciamento de genes nucleares (Monteiro et al., 2000; Bargues et al., 2002; Marcilla et al., 2002) e mitocondriais (García & Powell, 1998; Lyman et al., 1999; Monteiro et al., 2000; Monteiro et al., 2004; Hypsa et al., 2002).

O seqüenciamento de genes permite avaliar o polimorfismo do DNA, fornecendo informações para inferência filogenética bem como para a avaliação das relações entre organismos e populações. Diferentes genes do DNA mitocondrial e nuclear evoluem em

velocidades distintas e podem ser utilizados para diferenciar as espécies (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

O DNA mitocondrial (mtDNA) (Figura 3) corresponde a um genoma relativamente simples, de herança materna e que apresenta velocidade de mutação dez vezes mais rápida que as substituições do DNA nuclear (Avise et al., 1987). Diferenças nas seqüências de nucleotídeos de diferentes regiões do mtDNA também vêm sendo utilizadas para obtenção de informação sobre as relações evolutivas e estrutura populacional de algumas espécies de insetos (Lehmann et al., 2000).

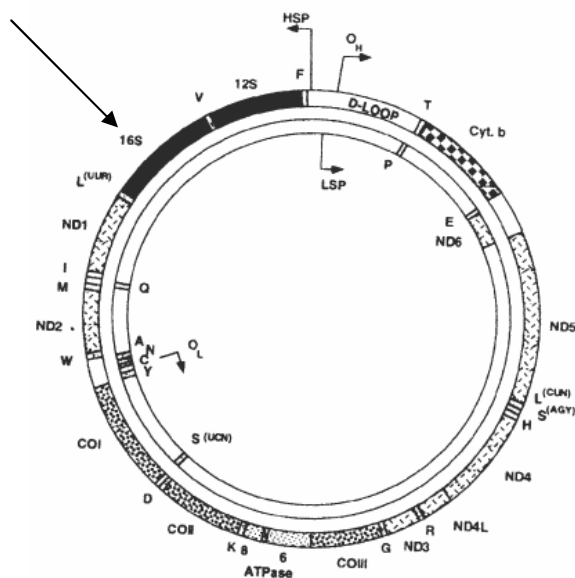


Figura 3. Esquema representativo, segundo Carvalho et al., (2002), da disposição de genes pertencentes ao DNA mitocondrial. O gene 16S está indicado pela seta.

Monteiro et al., (2003) analisaram a seqüência do gene citocromo b do DNA mitocondrial de *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius nasutus*. Por meio desse estudo, os autores puderam estabelecer grau de parentesco entre as três espécies estudadas, evidenciando uma diversidade entre indivíduos da espécie *Rhodnius robustus*.

Os genes mitocondriais 16S e citocromo b foram utilizados por Lyman et al. (1999) para promover a caracterização e filogenia de sete espécies de *Rhodnius*, sete espécies de

Triatoma, e mais quatro espécies de outros gêneros de triatomíneos. Os fragmentos do citocromo b comparados apresentaram maior variação (81%) em relação aos fragmentos da região 16S (99%), região mais conservada.

O DNA ribossomal é bem conservado e tem sido utilizado para pesquisas de sistemática e filogenia de organismos (Paskewitz *et al.* , 1993; Bargues *et al.* , 2000; Marcilla *et al.* , 2001). Está presente entre 100 a 1000 cópias por genoma, e em cada unidade são encontrados as subunidades 18S, 5,8S, 28S e dois espaçadores internos ITS-1 e ITS-2 (Hillis & Dixon, 1991; Paskewitz *et al.* , 1993).

A taxa de substituição dos nucleotídeos do espaçador ITS-2 para os Triatominae é de 0,4% a 1% por um milhão de anos, 23 a 55 vezes mais rápido que o gene 18S do DNA nuclear (Bargues *et al.*, 2000), e pode ser usado como marcador molecular para identificação de espécies (Marcilla *et al.* , 2002).

Por meio da técnica de PCR-RFLP, são utilizadas enzimas de restrição (endonucleases) para identificar sítios palindrômicos específicos tanto do DNA genômico quanto mitocondrial. É uma técnica barata, rápida e mais simples que o sequenciamento. Nela o polimorfismo das seqüências de DNA entre cada espécie é revelado pela diferença de tamanho dos fragmentos gerados, revelados por eletroforese (Muller e Wolfenbarger, 1999).

Os fragmentos de DNA produzem padrões de bandas diferentes quando examinadas em géis por eletroforese, isso permite a identificação de variabilidade entre as espécies (Meyer, 1997). Com essa técnica, Naegele *et al.*, (2006) conseguiram diferenciar *R. domesticus*; *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. stali*.

Justificativa:

Diotaiuti et al. (1995) e Costa et al. (2003) relataram que *T. sordida* ocupou nichos antes ocupados por *T. infestans* em localidades de municípios de Minas Gerais, evidenciando um exemplo de sucessão ecológica. O mesmo fato foi detectado por Almeida et al. (2000) que, conduziu um estudo no Sul do Brasil, mostrando que a incidência de *T. rubrovaria* estava aumentando, enquanto a de *T. infestans* decrescia.

Para melhor entendermos esses processos, precisamos conhecer mais a respeito da biologia dos triatomíneos, modo de infecção desses insetos pelo protozoário causador da doença e como ocorre sua transmissão ao homem. Uma das dificuldades em se combater os insetos vetores da doença é o fato de novas espécies ocuparem nichos que eram antes ocupados por outras, fenômeno conhecido como sucessão ecológica, sendo assim é preciso antes de mais nada identificar as espécies (Argolo et al., 2008).

Em publicação da Organização Mundial de Saúde foi relatada a dificuldade de diferenciar duas espécies do gênero *Rhodnius*: “Tem sido relatado na natureza em palmeiras e nos ninhos de aves, e podem colonizar casas por transporte passivo ou ativo. Sua origem silvestre permanece duvidosa devido à falta de diferenciação morfológica e isoenzimática entre *Rhodnius* encontrados nas palmeiras da Venezuela, identificados como *R. robustus* e *R. prolixus* típicos encontrados dentro das casas. Ele é capturado principalmente nos telhados de palha das casas, onde atinge altas densidades.” (WHO, 2002)

Diante da dificuldade de estabelecer diferenciação das espécies de *Rhodnius* por meio de caracteres morfológicos, e contribuir com a caracterização dessas espécies visando uma diferenciação prática entre elas, conta-se com a possibilidade de utilizar técnicas de biologia molecular como o sequenciamento de genes e PCR-RFLP (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

Objetivos:

- Estudar a diferenciação entre *R. brethesi*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. sp*, servindo-se da comparação do produto do seqüenciamento do gene mitocondrial 16S.

- Estudar a diferenciação entre *R. brethesi*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. sp*, utilizando enzimas de restrição nos genes 5,8S/ITS-2 do DNA ribossomal por meio da técnica PCR-RFLP.

Materiais e Métodos:

Espécies utilizadas:

As colônias de triatomíneos utilizadas no estudo são mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara em cubas de vidro fechadas com divisórias internas, identificadas nominal e numericamente (Colônia de Triatomíneos de Araraquara – CTA nº), mensalmente alimentadas com *Rattus norvegicus* (ratos), *Mus musculus* (camundongos) ou *Cairina moschata* (patos). Para este estudo foram utilizados exemplares de colônias de diferentes localidades servindo-se de um indivíduo de cada colônia (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Rhodnius* e respectivas colônias segundo procedência, número de registro de colônias de triatomíneos de Araraquara (CTA) e data de chegada ao laboratório.

Espécies	Procedência	(CTA)	Data de chegada no laboratório
<i>R. brethesi</i>	Barcelos-AM	222	20/7/2009
<i>R. nasutus</i>	Patú-RN	53	23/5/1983
<i>R. nasutus</i>	São Vicente-RN	211	23/9/2009
<i>R. neglectus</i>	Frutal-MG	67	23/5/1983
<i>R. neglectus</i>	Pitangueiras-SP	58	14/6/1982
<i>R. pictipes</i>	Jacundá-PA	71	23/5/1983
<i>R. prolixus</i>	Colômbia	76	8/2/1983
<i>R. prolixus</i>	Ortiz-Edoguarica Venezuela	79	5/9/1999
<i>R. robustus</i>	Lima -Perú	85	7/2/1982
<i>R. robustus</i>	Madre de Rios - Perú	86	3/6/1982
<i>R. sp</i>	Monte Negro-RO	88	18/9/2008

1. *Rhodnius brethesi* Matta, 1919

Os exemplares utilizados foram provenientes de progênie obtida a partir de uma fêmea e cinco machos coletados no igarapé Tucunaré do rio Curiduri, município de Barcelos/AM, pelo Prof. João Aristeu da Rosa em 20/07/09. Registro de colônia (CTA) número 222.

Encontrado na Venezuela e no Brasil nos Estados do Amazonas, Maranhão e Pará. Tamanho do macho 19-19,5mm e da fêmea 19-20mm. Coloração geral do corpo preta com pontos e listras marrons na superfície dorsal da cabeça e pescoço, pronoto, escutelo, conexivo e superfície ventral do abdômen. Conexivo com porções retangulares laranjas ou avermelhadas.

2. *Rhodnius neglectus* Lent, 1954

Foram utilizados exemplares de duas colônias de *R. neglectus*, uma proveniente do município de Frutal-MG, fazenda Três Barras, onde os insetos foram capturados em um galinheiro em 23/05/1983 com o registro de colônia (CTA) número 067. A outra colônia é oriunda de Pitangueiras-SP, coletada em uma macaúba na estrada que liga Pitangueiras a Bebedouro em 14/06/1982, CTA 058.

Para essa espécie, o tamanho aproximado do macho é de 17,5 a 19,0 mm e da fêmea 18,5 a 20,5 mm. Coloração marrom claro com marcas escuras na cabeça, pronoto, escutelo, corium e conexivo, e áreas amareladas no abdômen ventral, no conexivo e na coxa e trocantes. Distribuição no Brasil nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo. Essa espécie é predominantemente silvestre e têm sido encontrada na copa de palmeiras como *Orbignia phalerata* (babaçu), *Acroconia aculeata* (macaubeira), *Mauritia flexuosa* (buriti) e *Syagrus corenata* (uricuri). Também é encontrada em habitações humanas, galinheiros, chiqueiros e outras localidades peridomiciliares (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et al. 2003).

3. *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927

Foram utilizados as colônias CTA 085 e CTA 086 do insetário de Triatominae, provenientes de Lima, Peru e Madre de Dios, Peru. A primeira mantida em laboratório desde 07/02/1972 e a segunda desde 03/06/1982.

Tamanho do macho de 20-23,5mm e da fêmea de 23-26 mm. A coloração geral do corpo é marrom amarelado com muitas manchas escuras em várias regiões do corpo. Tem sido coletados exemplares na Bolívia, Brasil (Amazonas e Pará), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela. Essa espécie é muito próxima ao *R. prolixus*, sendo muito parecidas em suas características morfológicas e cromáticas (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et al. 2003).

4. *Rhodnius prolixus* Stål, 1859

Utilizou-se exemplares de duas populações de *R. prolixus*, CTA 076 enviada por Alberto Morales do Insetário Nacional de Saúde de Bogotá Colômbia, coletada em 15/12/1976. A outra colônia, CTA 079, tem origem na cidade de Ortiz na Venezuela em 05/09/1999.

Tamanho do macho entre 17,5 a 20,0 mm e da fêmea de 19,5 a 21,5mm. Coloração geral do corpo é marrom amarelado com muitas manchas escuras espalhadas em várias regiões do corpo. Tem distribuição registrada para a Bolívia, Brasil (Amazonas, Goiás e Pará), Colômbia, Costa Rica, Ecuador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, El Salvador, Suriname e Venezuela. Essa espécie é bem adaptada a habitações humanas e é muito importante como vetor da doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa, sendo na Venezuela o principal vetor. Pode ser encontrada nos ambientes de criação de animais nos peridomicílios, ninhos de pássaros e em palmeiras, e sua disseminação é facilitada pelos pássaros que carregam os ovos para outros lugares ou por meio das folhas das palmeiras utilizadas para cobrir algumas casas (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et al. 2003).

5. *Rhodnius pictipes* Stål, 1872

A população utilizada é proveniente de Jacundá-PA coletado em ambiente silvestre em 23/05/1983, CTA 71.

Macho com 15 a 20mm de comprimento e fêmea com 16,5 a 22,0mm. Coloração geral do corpo marrom amarelada com manchas escuras espalhadas por todo corpo, sobretudo pontilhadas. Tem sua distribuição localizada em Belize, Bolívia, Brasil (Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Pará), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, Trinidad e Venezuela. É uma espécie basicamente silvestre encontrada em palmeiras e bromélias, mas

exemplares também tem sido encontrados em moradias humanas (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et al. 2003).

6. *Rhodnius nasutus* Stål, 1859

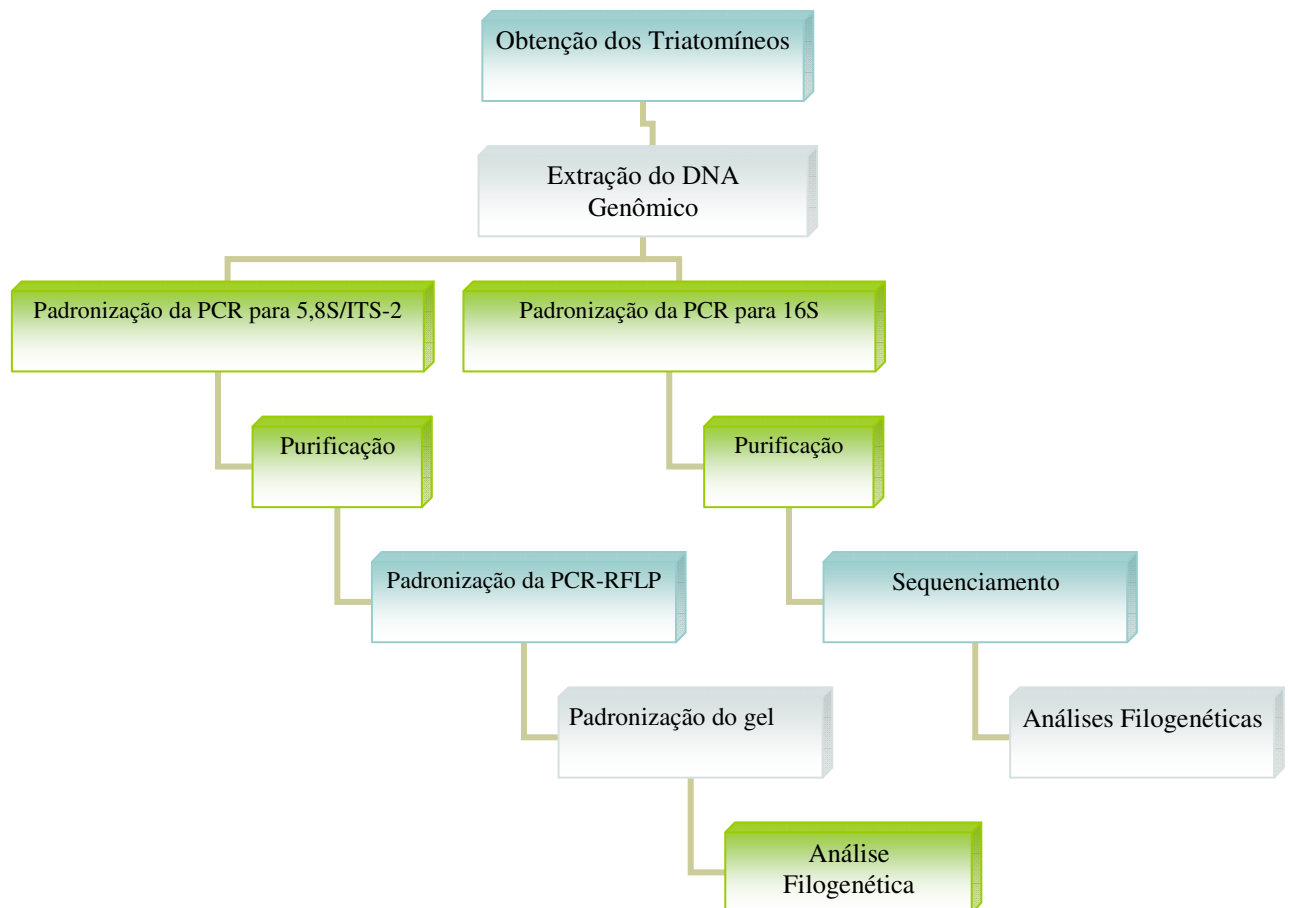
As populações estudadas são provenientes de Patú no Rio Grande do Norte (CTA 53) em 23/05/1983, e São Vicente/RN (CTA 211) em 23/09/2009, ambas coletadas em ambientes peridomiciliar.

Tamanho do macho de 12,5 a 16,5 mm e da fêmea 14 a 18 mm. Coloração marrom amarelado pálido, freqüentemente avermelhado, com pontos mais escuros em algumas regiões do corpo. Distribuído pelo Brasil nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. Espécie restrita ao nordeste árido brasileiro, encontrado em habitações humanas, porém não completamente adaptados aos domicílios. Também encontrado em galinheiros. Espécie próxima de *R. neglectus* e *R. prolixus* (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et al. 2003).

7. *Rhodnius* sp.

Espécie de *Rhodnius* em processo de descrição, mantida no laboratório. Foi coletada no município de Monte Negro/RO em 18/09/08 em um babaçu (*Orbignya phalerata*). Foram coletados oito exemplares que deram início à colônia CTA 88.

Etapas do estudo:



Extração do DNA genômico:

A extração do DNA foi feita utilizando-se da metodologia proposta por Bargues & Mas-Coma (1997), com modificações:

O tecido do qual se realizou a extração do DNA genômico foi a musculatura da perna por ser livre de microrganismos contaminantes e simbiontes. As seis pernas foram limpas com lisofórmio, extraídas com auxílio de uma pinça previamente esterilizada, removidas e acondicionadas em *ependorfs* de 1,5 ml, onde foram trituradas com nitrogênio líquido. Posteriormente foram adicionados 400µl de solução de lise e novamente trituradas.

Ao lisado foi adicionado proteinase K 500µg/ml, homogeneizado e mantido em banho-maria a 55°C por doze horas. Foi adicionado 500µl de fenol:clorofórmio (24:1), centrifugado a 14000 rpm por três minutos e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro *ependorf*, onde foram adicionados 2µl de RNase (10ug/100ml) e incubado em banho-maria a 37° por uma hora.

Após a incubação, foi adicionado 400µl de fenol:clorofórmio(24:1) e centrifugado a 14000 rpm por três minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novo *ependorf* onde foram adicionados 400µl fenol:clorofórmio:álcool isoamílico(25:24:1) e centrifugado a 14000 rpm por mais três minutos. O sobrenadante novamente foi transferido para novo *ependorf* e adicionado 400µl de clorofórmio:álcool isoamilico(24:1), centrifugado a 14000 rpm por três minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi colocada em tubo definitivo, onde foi adicionado 40µl de acetato de amônio 4M e 1ml de etanol absoluto gelado, e então centrifugado a 4°C, 14000 rpm por 10 minutos.

A fase aquosa foi descartada e o sedimento resuspendido em 400 µl de etanol 70% gelado, centrifugado a 4°C 14000 rpm por 10 minutos. Todo sobrenadante foi retirado e o sedimento seco no *speedy vacuum*. O DNA precipitado foi ressuspendido em 50µl de água Mili-Q e mantido em geladeira.

Para a determinação da concentração do DNA genômico foi utilizado o aparelho *ThermoScientific NanoDrop 2000*.

Amplificação do DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para amplificação das seqüências gênicas foi utilizado termociclador *Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™*.

As concentrações dos reagentes foram: 100ng DNAG; 100µM dNTP; 10picomols de cada primer (Foward e Reverse); 2mM de MgCl₂; 1U enzima Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen); Tampão 10X livre de MgCl₂; Água Mili-Q qsp 50µl.

A confirmação da reação de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, corada com brometo de etídio, observada em transiluminador com luz UV.

A amplificação do gene 16S foi feita por alterações no protocolo sugerido por Lyman et al. (1999), de modo a obter produtos de aproximadamente 400pb. Protocolo para amplificação: desnaturação inicial do DNA (94°C por 5 minutos); 40 vezes desnaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (50°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 1 minutos); extensão final (72°C por 7 minutos) e à 4°C por tempo indefinido.

A padronização para amplificação dos genes 5,8S/ITS-2 foi feita por modificações no protocolo sugerido por Marcilla et al. (2001) esperando-se obter fragmento de DNA de aproximadamente 1200pb. Protocolo para amplificação: desnaturação inicial do DNA (94°C por 5 minutos); 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (54°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minutos); extensão final (72°C por 7 minutos), e à 4°C por tempo indefinido.

Os iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação do gene 16S foram extraídos de Lyman et al. (1999) e para 5,8S/ITS-2 de Marcilla et al. (2001) (Tabela 2):

Tabela 2. Primers usados para amplificação dos genes 16S mitocondrial e 5,8S/ITS-2 ribossomal.

Genes	Primers
16S	Foward 5' – CRC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3'
	Reverse 5' – AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA – 3'
5,8S/ITS-2	Foward 5'- CTA AGC GGT GGA TCA CTC GG - 3'
	Reverse 5' – GCA CTA TCA AGC AAC ACG ACT C – 3'

Purificação dos produtos amplificados

Os fragmentos amplificados foram purificados por meio do kit “Illustra GFX DNA and Band Purification Kit” (GE life sciences). Os produtos de PCR, visualizados por eletroforese, que apresentaram uma única banda no gel foram purificados a partir da solução de PCR, e quando houve presença de banda inespecífica, a banda de interesse foi recortada do gel e então purificada.

Os produtos purificados foram quantificados no aparelho Thermo Scientific NanoDrop 2000, objetivando-se obter amostras com concentração aproximada de 19 ng/μl. As amostras que estiveram fora do padrão de concentração passaram por processo de diluição ou concentração até atingir a concentração esperada.

Seqüenciamento

Os produtos da PCR de seqüenciamento foram precipitados com isopropanol 75%. As amostras foram então incubadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos e centrifugadas por 15 minutos a 14000rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 70%, centrifugado a 14000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco a vácuo. As amostras foram ressuspensas em 2μL de *Loading buffer* momentos antes de serem processadas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 DNA Analysis Systems.

Os produtos purificados foram seqüenciados utilizando *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)*. O seqüenciamento foi feito a partir das extremidades senso e anti-senso para gerar uma seqüência consenso, por isso a PCR de seqüenciamento foi feita com os mesmos *primers* usados na amplificação das seqüências de DNA.

Análise dos dados:

As seqüências resultantes deste trabalho (Figura 9) e as obtidas do banco de dados do “National Center of Biotechnology Information” – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabela 3), foram analisadas com o software “BioEdit Sequence Aligment Editor V. 7.0.5” e alinhadas por meio do programa Clustal W (Hall, 1999). As seqüências de fragmentos depositadas no GenBank (Tabela 3) são usadas para dar suporte à análise filogenética das amostras em estudo.

[Tabela 3. Código de acesso aos fragmentos de gene 16S de uma espécie de *Panstrongylus*, onze de *Rhodnius* e duas de *Triatoma*, obtidos junto ao “National Center of Biotechnology Information” – NCBI.

Espécies	Código de acesso	Referências
<i>P. megistus</i>	AF045701	Lyman et al. 1999
<i>R. brethesi</i>	AF045710	Lyman et al. 1999
<i>R. colombiensis</i>	AY035438	Hypsa et al. 2002
<i>R. domesticus</i>	AY035440	Hypsa et al. 2002
<i>R. ecuadorensis</i>	AF028746	Stothard et al. 1998
<i>R. neglectus</i>	AF045704	Lyman et al. 1999
<i>R. neivai</i>	AY035441	Hypsa et al. 2002
<i>R. pallescens</i>	AF045706	Lyman et al. 1999
<i>R. pictipes</i>	AF045709	Lyman et al. 1999
<i>R. prolixus</i>	AF045707	Lyman et al. 1999
<i>R. robustus</i>	AF045705	Lyman et al. 1999
<i>R. stali</i>	EU867802	Maia et al. 2009
<i>T. infestans</i>	AF045700	Lyman et al. 1999
<i>T. sordida</i>	AF045703	Lyman et al. 1999

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se do programa Mega 4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Foram empregados os parâmetros analíticos de máxima parcimônia (*Maximum Parsimony* - MP), de distância (*Neighbor-Joining*- NJ) e de distanciamento por pares (UPGMA). Para o procedimento dessas análises foi utilizado o parâmetro de Kimura com valor 1000 para o Bootstrap (Kimura et al., 2008). O alinhamento do produto de sequenciamento do gene 16S foi processado com o programa DnaSp V.5 para avaliação dos sítios polimórficos.

PCR-RFLP

Entre os exemplares representados por mais de um CTA (Tabela 1), foi selecionada uma colônia para realizar as reações. Os produtos de amplificação dos genes 5,8S/ITS-2 foram incubados por três horas com enzimas de restrição (Tabela 4) em reações isoladas. Essa metodologia foi eficaz para diferenciação de *R. stali*, *R. pictipes*, *R. domesticus* e *R. prolixus* por Naegele et al., (2006).

Tabela 4. Enzimas utilizadas para distinção das espécies de *Rhodnius*.

Enzimas	Palíndromos	Temperatura	Tampão
BstUI**	5' CG↓CG 3'	60°C	Reativo 2
Hha I*	5' GCG↓C 3'	37°C	Reativo 2
Mbol I*	5' ↓GATC 3'	37°C	Reativo 2
Hinf I*	5' G↓ANTC3'	37°C	Reativo 2
Hae III*	5' GG↓CC 3'	37°C	Reativo 2
Rsa I*	5' GT↓AC 3'	37°C	Reativo 1
**	New England Labs		
*	Invitrogen - Life Technologies		

A diferença entre os tampões, Reativos 1 e 2, consistiu na presença de cloreto de sódio no reativo 2:

Reativo 1: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂;

Reativo 2: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM MgCl₂ e 50 mM NaCl.

No intuito de ampliar e aprimorar o estudo de Naegele et al. (2006), a técnica de PCR-RFLP também foi avaliada para as espécies *R. brethesi*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. sp* em reações utilizando combinações de enzimas (Quadro 1). As reações foram realizadas com volume e concentração dos reagentes conforme descrito na Tabela 5.

Quadro 1. Quadro com a combinação de enzimas utilizadas e as amostras em que foram aplicadas.

Enzimas	Amostras
BstUI, HhaI, MbolI e RsaI (isoladas)	<i>R. brethesi</i> CTA 222; <i>R. sp</i> CTA 88; <i>R. neglectus</i> CTA 67; <i>R. pictipes</i> CTA 71; <i>R. prolixus</i> CTA 76; <i>R. robustus</i> CTA 85; <i>R. nasutus</i> CTA 53
HinfI + HaeIII, MbolI + HinfI, MbolI + HaeIII	<i>R. prolixus</i> CTA 79; <i>R. neglectus</i> CTA 58; <i>R. robustus</i> CTA 86
HinfI + HaeIII + RsaI	<i>R. brethesi</i> CTA 222; <i>R. nasutus</i> CTA 53, <i>R. nasutus</i> CTA 211; <i>R. neglectus</i> CTA 58; <i>R. neglectus</i> CTA 67; <i>R. pictipes</i> CTA 71; <i>R. prolixus</i> CTA 79; <i>R. prolixus</i> CTA 85; <i>R. robustus</i> CTA 86; <i>R. sp</i> CTA 88; <i>T. brasiliensis</i> CTA 203

Tabela 5. Volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de RFLP.

Componentes	Volume (μ l)	Concentração Final
DNA amplificado (200ng - 1 μ g)	7	
Tampão (10X)	2	1X
Enzima	0,5	5U*
Água Mili-Q qsp 20 μ l	11,5	

* Uma unidade é a quantidade necessária para digerir completamente 1 μ g de DNA em uma hora no tampão e temperatura ideal para enzima em 20 μ l de reação (Sambrook et al., 1989)

Para visualização das bandas geradas pela restrição das enzimas, foi feita eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio ou Nancy 520 da Sigma-Aldrich, em corrida sob tensão de 120V por uma hora. Os géis foram fotografados em aparelho Imagemaster VDS – Pharmacia Biotech e analisados visualmente comparando-se as bandas obtidas com as do peso molecular.

Análise Filogenética das amostras obtidas por PCR-RFLP.

Por visualização das bandas apresentadas no gel de agarose (Figura 17) foi feita uma matriz indicando presença (um) ou ausência (zero) das bandas para cada amostra (Tabela 6). Essa matriz foi processada no programa *Multi Variate Statistical Program 3.1* com análise estatística UPGMA, e então foi gerando um dendograma (Figura 18) e uma tabela com o coeficiente de similaridade entre as espécies (Tabela 7).

Dessa maneira, espécies que apresentam bandas de mesmo tamanho são mais próximas filogeneticamente, enquanto bandas com tamanhos distintos as distanciam. A análise estatística UPGMA se baseia na comparação das espécies por pares, a partir dela é possível comparar o resultado obtido pela técnica de PCR-RFLP com outros realizados a partir de outras metodologias, como o sequenciamento de gene.

Resultados:

Extração do DNA genômico

A extração do DNA forneceu em média 100 a 190ng de DNA/ μ L por exemplar. Dessa forma, utilizou-se 1 μ L de amostra para cada reação de amplificação, quantidade que forneceu resultados satisfatórios à PCR. O DNA de *R. nasutus* CTA 222 foi extraído num segundo momento com a chegada do exemplar no laboratório (Figuras 4 e 5):

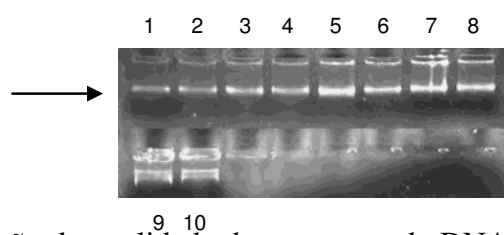


Figura 4. Avaliação da qualidade das amostras de DNA genômico extraídos de triatomíneos. Eletroforese com gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Seta indicando as bandas referentes ao DNA genômico extraído. Amostras 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. nasutus* CTA 53; 3) *R. sp* CTA 88; 4) *R. neglectus* CTA 58; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6) *R. pictipes* CTA 71; 7) *R. prolixus* CTA 76; 8) *R. prolixus* CTA 79; 9) *R. robustus* CTA 85 e 10) *R. robustus* CTA 86.

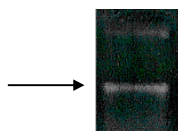


Figura 5. Avaliação da qualidade das amostras de DNA genômico extraídos da amostra de *R. nasutus* CTA 211. Eletroforese com gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Padronização das reações de PCR

Foram obtidas amplificações de aproximadamente 400pb para o DNA ribossomal 16S e 1200pb para 5,8S/ITS-2 (Figuras 6 e 7).

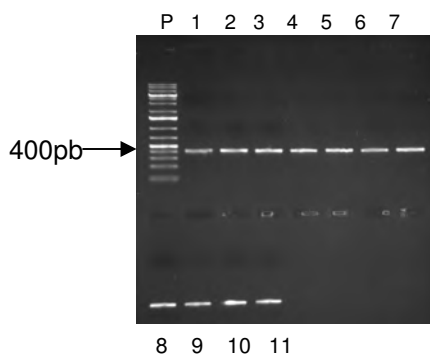


Figura 6. Eletroforese da amplificação do fragmento 16S em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM – Peso molecular 1Kb Plus. Exemplos: 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. nasutus* CTA 53; 3) *R. sp* CTA 88; 4) *R. neglectus* CTA 58; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6) *R. pictipes* CTA 71; 7) *R. prolixus* CTA 76; 8) *R. prolixus* CTA 79; 9) *R. robustus* CTA 85; 10) *R. robustus* CTA 86; 11) *R. nasutus* CTA 211.

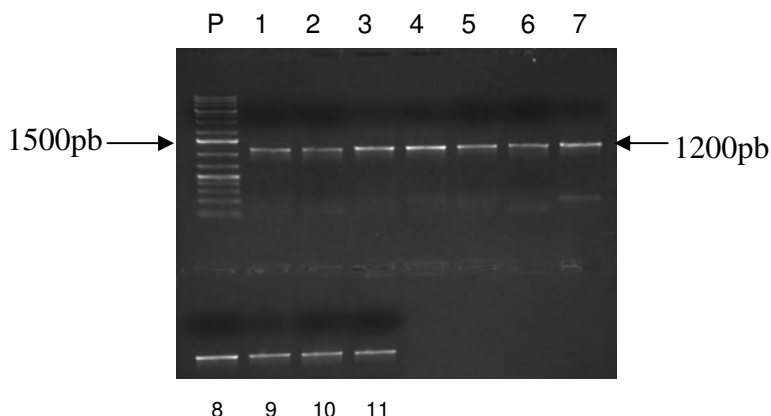


Figura 7. Eletroforese da amplificação do fragmento 5,8S/ITS-2 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM – Peso molecular 1Kb Plus. Exemplos: 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. nasutus* CTA 53; 3) *R. sp* CTA 88; 4) *R. neglectus* CTA 58; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6) *R. pictipes* CTA 71; 7) *R. prolixus* CTA 76; 8) *R. prolixus* CTA 79; 9) *R. robustus* CTA 85; 10) *R. robustus* CTA 86; 11) *R. nasutus* CTA 211.

Sequenciamento do gene mitocondrial 16S

Os sequenciamentos das fitas *forward* e *reverse* do gene 16S foram alinhados no programa BioEdit e então foi gerada uma seqüência consenso para cada espécie. As seqüências das espécies *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, foram alinhadas gerando 380 pares de bases (Figura 8), e as seqüências das amostras de *R. prolixus* CTA 79 e *R. neglectus* CTA 58 não foram incluídas no estudo pois não saíram com boa qualidade.

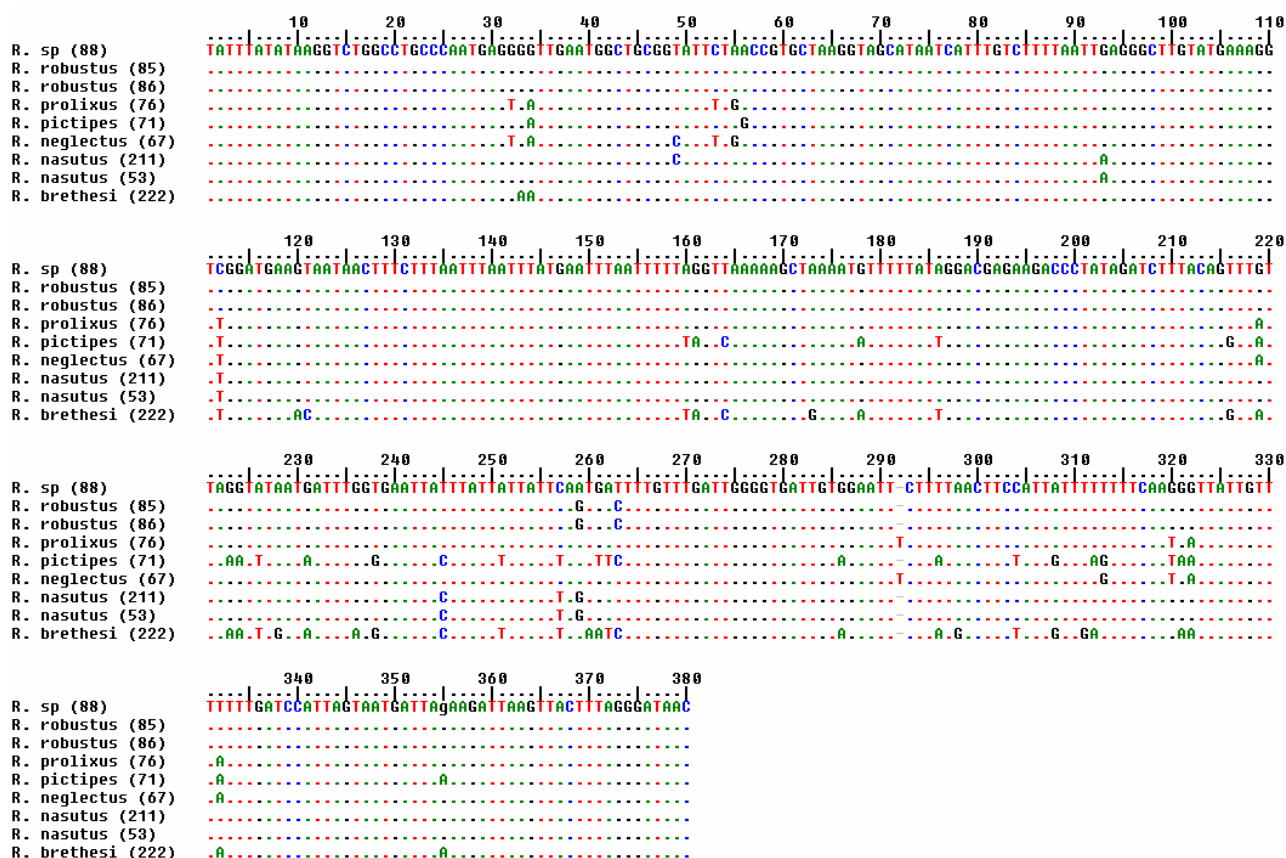


Figura 8. Alinhamento das seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial dos exemplares: *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86 e *R. nasutus* CTA 211.

Posteriormente, foram inclusos seqüenciamentos do gene 16S obtidos do “*National Center of Biotechnology Information*” – NCBI (Tabela 3) às amostras seqüenciadas, gerando seqüências alinhadas de 371 pares de bases (Figura 9).

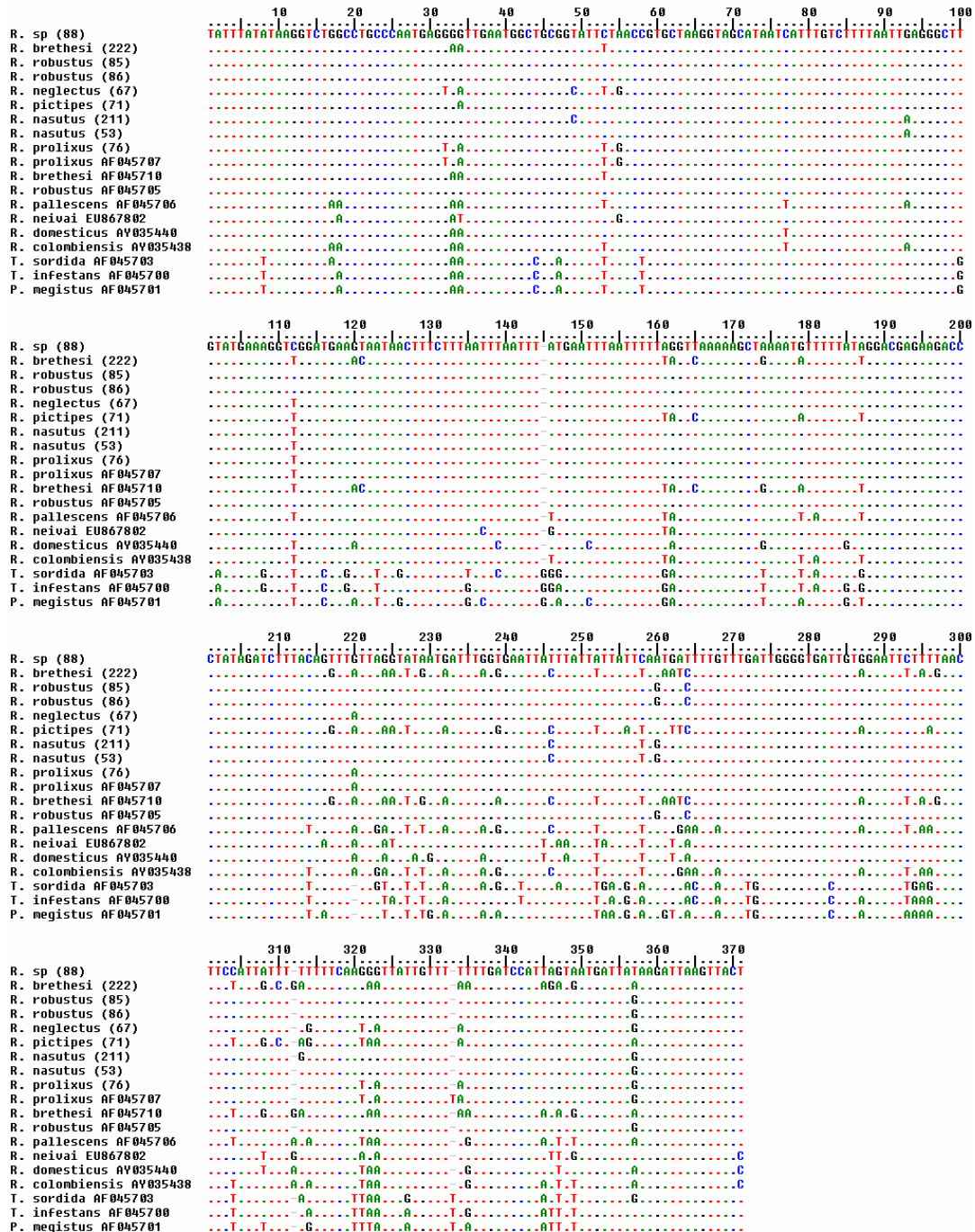


Figura 9. Alinhamento das seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial dos exemplares: *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86 e *R. nasutus* CTA 211 junto com as seqüências obtidas do NCBI (Tabela 2).

Análise filogenética utilizando o gene 16S

A partir dos alinhamentos foram feitas análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 4. Nesse programa foram depositados os alinhamentos da Figura 8 e Figura 9, e processados mediante os métodos analíticos de distância (*Neighbor-Joining*- NJ) (Figuras 10 e 11), *Máxima Parcimônia* (Maximum Parsimony - MP) (Figuras 12 e 13) e comparação por pares UPGMA (Figuras 14 e 15), todos utilizando os parâmetros de Kimura-2 e valor de 1000 para o Bootstrap. Não foram utilizadas as sequencias das amostras de *R. prolixus* CTA 79 e *R. neglectus* CTA 58 pois não apresentaram boa qualidade de sequenciamento.

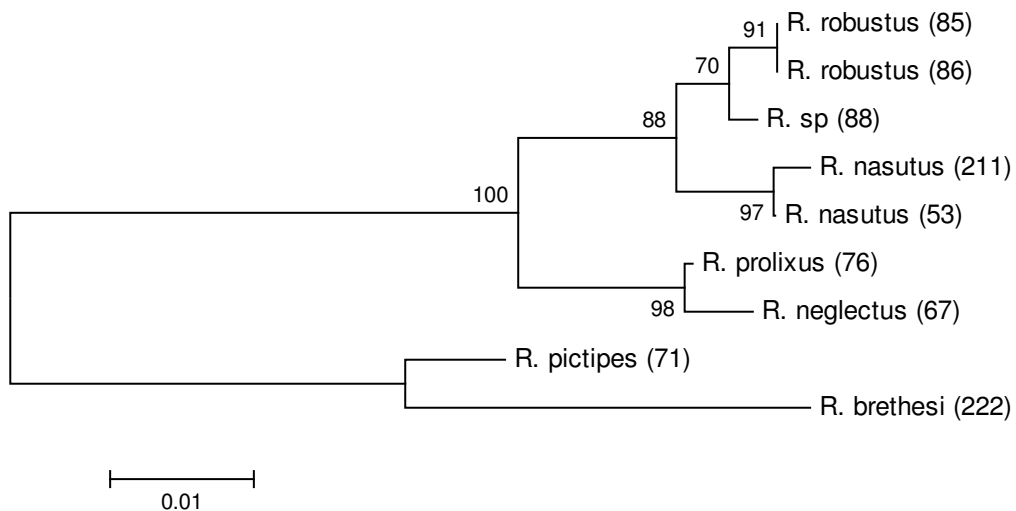


Figura 10. Dendrograma utilizando o método de Neighbor-Joining por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211.

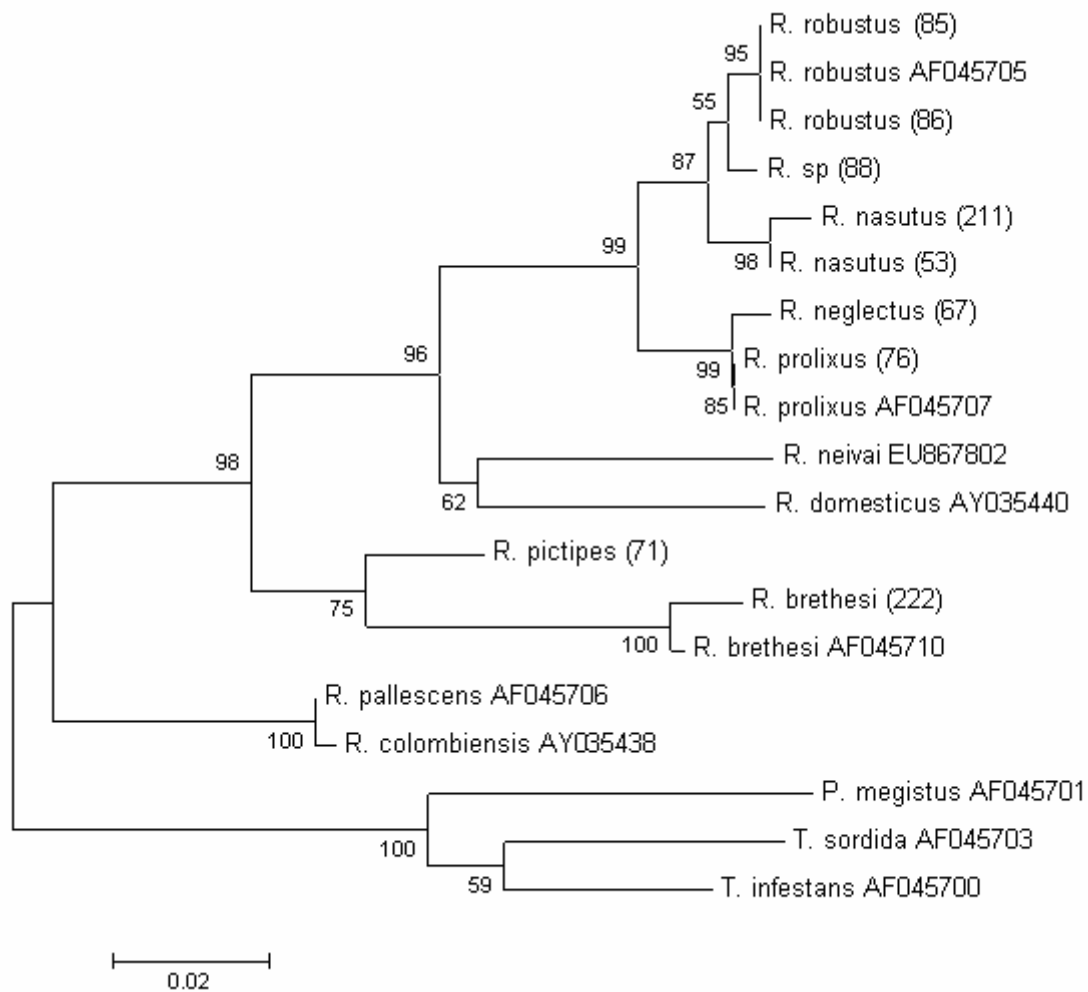


Figura 11. Dendrograma utilizando o método de Neighbor-Joining por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 58; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, junto com os obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

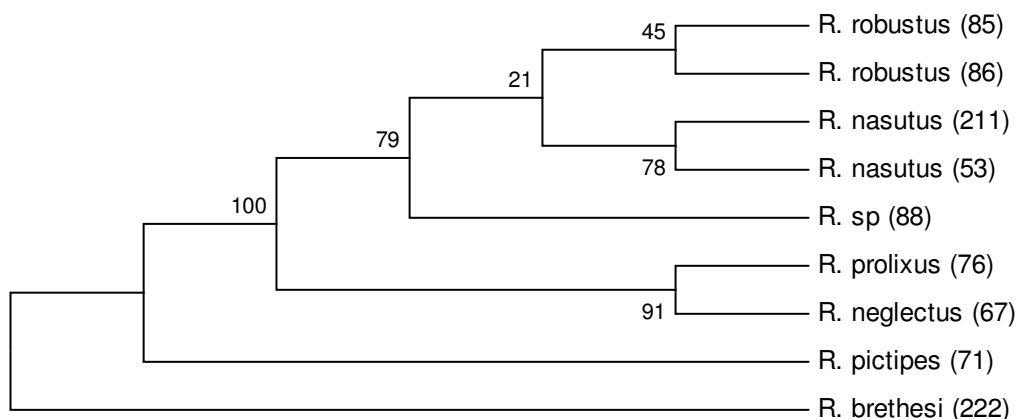


Figura 12. Dendograma utilizando o método de Máxima Parcimônia por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 58; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211.

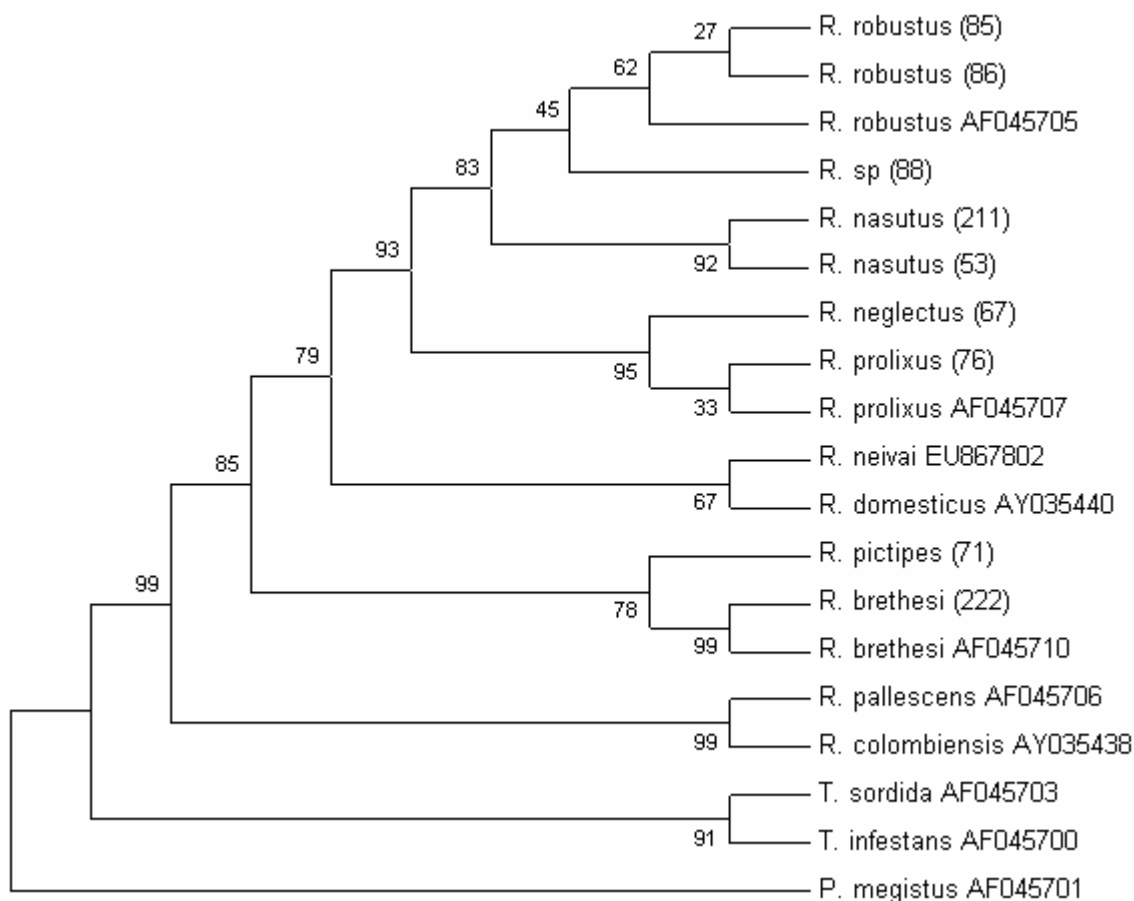


Figura 13. Dendograma utilizando o método de Máxima Parcimônia por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, junto com os obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

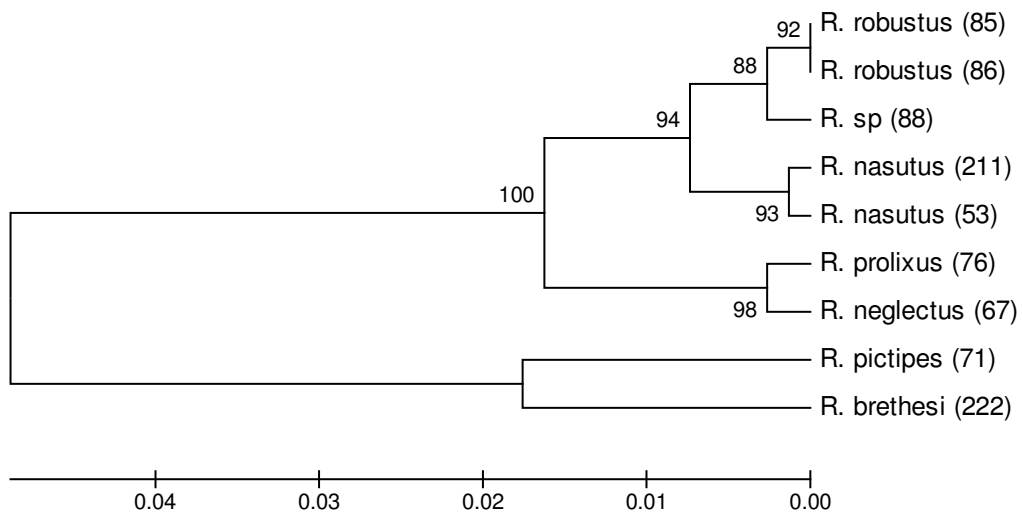


Figura 14. Dendrograma utilizando o método de UPGMA por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211.

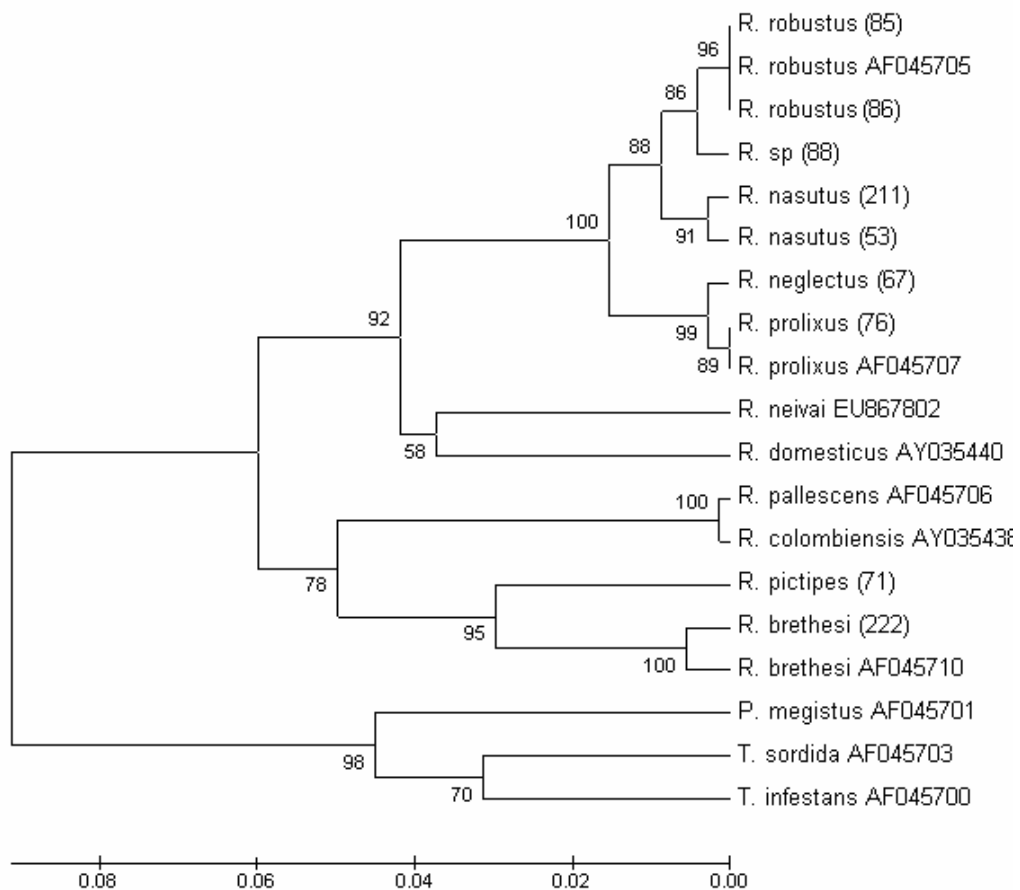


Figura 15. Dendrograma utilizando o método de UPGMA por meio do programa MEGA 4, para os exemplares *R. brethesi* CTA 222; *R. nasutus* CTA 53; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85; *R. robustus* CTA 86; *R. nasutus* CTA 211, junto com os obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

Análise dos fragmentos gerados pela PCR-RFLP

As bandas geradas pela digestão do produto de amplificação do gene 5,8S/ITS-2 com as enzimas de restrição foram evidenciadas por eletroforese em géis de agarose a 2% corados com brometo de etídio ou Nancy 520 da Sigma Aldrich.

A utilização das enzimas de restrição *Bst*UI, *Hha*I, *Mbo*I e *Rsa*I em amostras de sete espécies de *Rhodnius* (Figura 16) possibilitou a distinção das espécies em estudo com exceção de *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus*.

As bandas visualizadas no gel de agarose da Figura 16 foram registradas no Quadro 2 e posteriormente convertidas em uma matriz binária, com 0 (zero) indicando ausência de fragmento e 1 (um) a presença do mesmo (Tabela 7). Os dados dessa tabela foram processados com o programa Multi Variate Statistical Program 3.1 para se obter o coeficiente de similaridade entre as espécies (Tabela 8) e os dendogramas (Figuras 17 e 18).

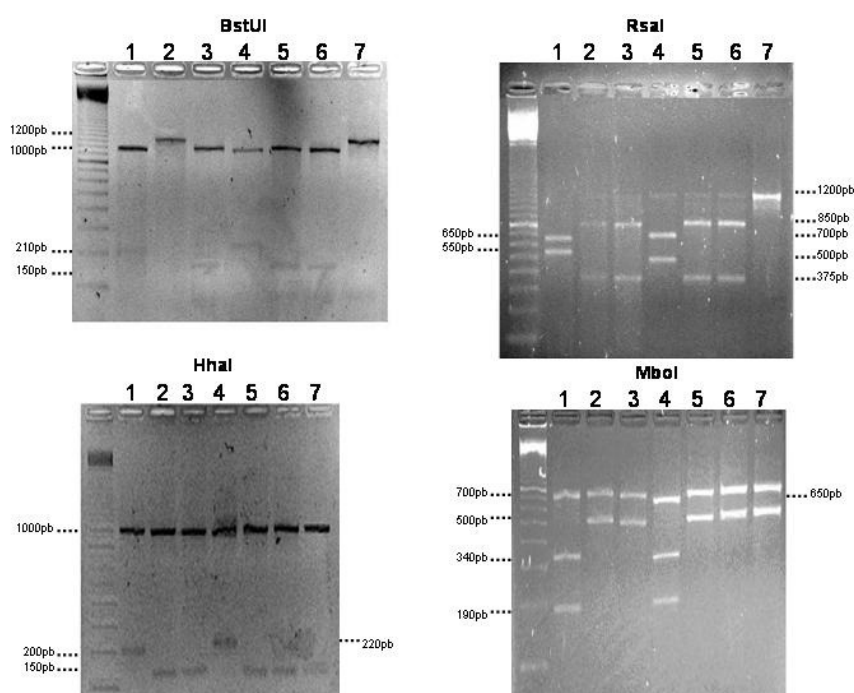


Figura 16. “Fingerprint” das espécies 1) *R. brethesi* CTA 222; 2) *R. sp* CTA 88; 3) *R. neglectus* CTA 67; 4) *R. pictipes* CTA 71; 5) *R. prolixus* CTA 76; 6) *R. robustus* CTA 85 e 7) *R. nasutus* CTA 53, nessa ordem, gerados pelas enzimas *Bst*UI, *Hha*I, *Mbo*I e *Rsa*I em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. Padrão de PM 100pb.

Quadro 2. Fragmentos gerados pela digestão do gene 5,8S/ITS-2 com enzimas de restrição em reações isoladas por meio da técnica de PCR-RFLP. Visualizados em gel de agarose 2,0%, comparados com padrão de PM de 100pb.

Enzimas	Espécies	Fragmentos (pb)
BstUI	<i>R. brethesi</i>	1000 e 210
	<i>R. sp</i>	1200
	<i>R. neglectus</i>	1000 e 150
	<i>R. pictipes</i>	980 e 210
	<i>R. prolixus</i>	1000 e 150
	<i>R. robustus</i>	1000 e 150
	<i>R. nasutus</i>	1200
MboII	<i>R. brethesi</i>	700, 340 e 190
	<i>R. sp</i>	700 e 500
	<i>R. neglectus</i>	650, 340 e 190
	<i>R. pictipes</i>	650, 340 e 190
	<i>R. prolixus</i>	700 e 500
	<i>R. robustus</i>	700 e 500
	<i>R. nasutus</i>	700 e 500
RsaI	<i>R. brethesi</i>	650 e 550
	<i>R. sp</i>	850 e 375
	<i>R. neglectus</i>	850 e 375
	<i>R. pictipes</i>	70 e 500
	<i>R. prolixus</i>	850 e 375
	<i>R. robustus</i>	850 e 375
	<i>R. nasutus</i>	1200
HhaI	<i>R. brethesi</i>	1000 e 200
	<i>R. sp</i>	1000 e 150
	<i>R. neglectus</i>	1000 e 150
	<i>R. pictipes</i>	1000 e 220
	<i>R. prolixus</i>	1000 e 220
	<i>R. robustus</i>	1000 e 150
	<i>R. nasutus</i>	1000 e 150

Tabela 7. Matriz binária da restrição dos genes 5,8S/ITS-2 utilizando as enzimas BstUI, HhaI, RsaI e MboII.

Fragmentos (pb)*	<i>R. brethesi</i>	<i>R. sp</i>	<i>R. neglectus</i>	<i>R. pictipes</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>R. robustus</i>	<i>R. nasutus</i>
1200	0	1	0	0	0	0	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
980	0	0	0	1	0	0	0
850	0	1	1	0	1	1	0
700	1	1	1	1	1	1	1
650	1	0	0	1	0	0	0
550	1	0	0	0	0	0	0
500	0	1	1	1	1	1	1
375	0	1	1	0	1	1	0
340	1	0	0	1	0	0	0
220	0	0	0	1	0	0	0
210	1	0	0	1	0	0	0
200	1	0	0	0	0	0	0
190	1	0	0	1	0	0	0
150	0	1	1	0	1	1	1

* Fragmentos gerados por RFLP em gel de agarose comparados com padrão de 100pb. Número 1 (um) indica a presença de um determinado fragmento e 0 (zero) a ausência deste.

Tabela 8. Coeficiente de similaridade entre as espécies, gerado pelo programa Multi Variate Statistical Package 3.1.

	<i>R. brethesi</i>	<i>R. sp</i>	<i>R. neglectus</i>	<i>R. pictipes</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>R. robustus</i>	<i>R. nasutus</i>
<i>R. brethesi</i>	1						
<i>R. sp</i>	0,154	1					
<i>R. neglectus</i>	0,167	0,857	1				
<i>R. pictipes</i>	0,455	0,25	0,273	1			
<i>R. prolixus</i>	0,167	0,857	1	0,273	1		
<i>R. robustus</i>	0,167	0,857	1	0,273	1	1	
<i>R. nasutus</i>	0,1	0,429	0,286	0,222	0,286	0,286	1

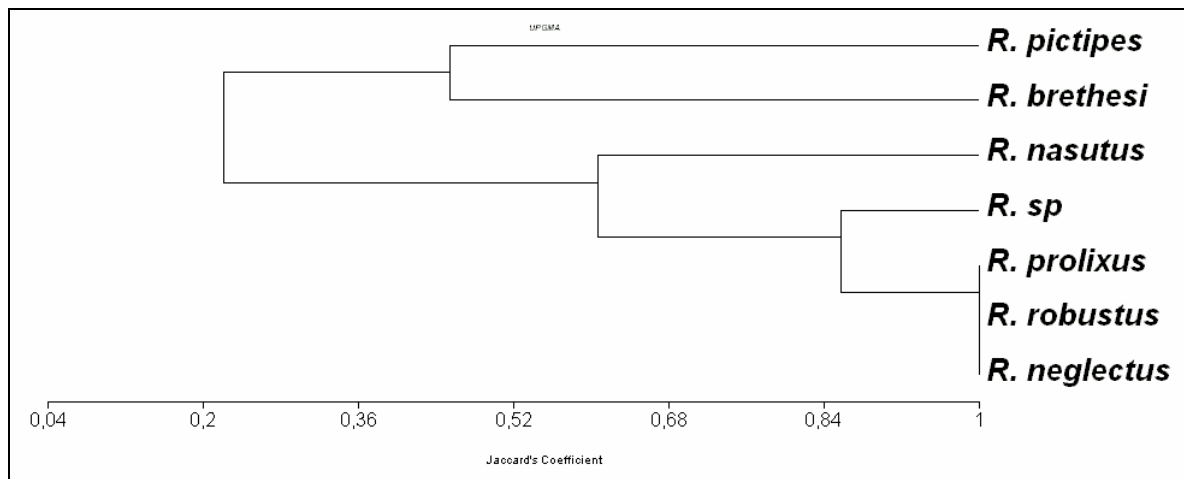


Figura 17. Dendrograma construído utilizando o método UPGMA com coeficiente de Jaccard para as amostras *R. brethesi* CTA 222; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85 e *R. nasutus* CTA 53.

As amostras presentes no dendrograma da Figura 17 foram analisadas em conjunto com as de *R. domesticus* e *R. stali* obtidas por Naegele et al. (2006), resultando no dendrograma da Figura 18.

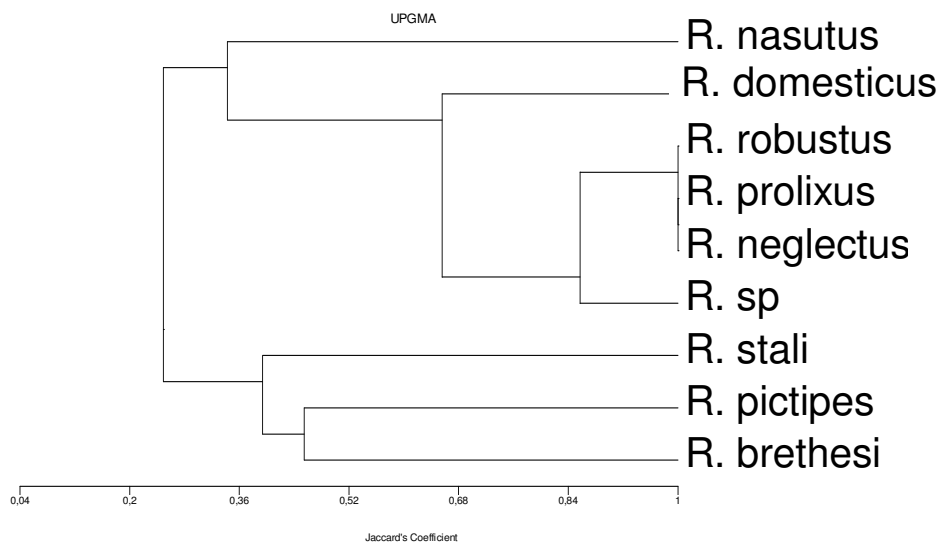


Figura 18. Dendrograma construído utilizando-se o método UPGMA com coeficiente de Jaccard para as amostras *R. brethesi* CTA 222; *R. sp* CTA 88; *R. neglectus* CTA 67; *R. pictipes* CTA 71; *R. prolixus* CTA 76; *R. robustus* CTA 85 e *R. nasutus* CTA 53 junto com os dados das amostras de *R. domesticus* e *R. stali*, estudadas por Naegele et al. 2006.

Quando da utilização das enzimas *HinfI* + *HaeIII* + *RsaI* em uma única reação não foi possível diferenciar *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*, e também *R. sp* e *R. nasutus* (Figura 19 e Quadro 3).

A reação com as enzimas *RsaI* + *HaeIII* + *HinfI* (Figura 19) foi feita com todas amostras disponíveis no laboratório, por isso foram inclusas algumas espécies repetidas, o que contribui para avaliar a reprodutibilidade da técnica entre diferentes indivíduos de mesma espécie. Foram utilizadas nesse trabalho duas amostras de *Triatoma brasiliensis* como grupo externo. O DNA genômico dessas duas amostras pertencem a outro projeto desenvolvido no laboratório de Parasitologia.

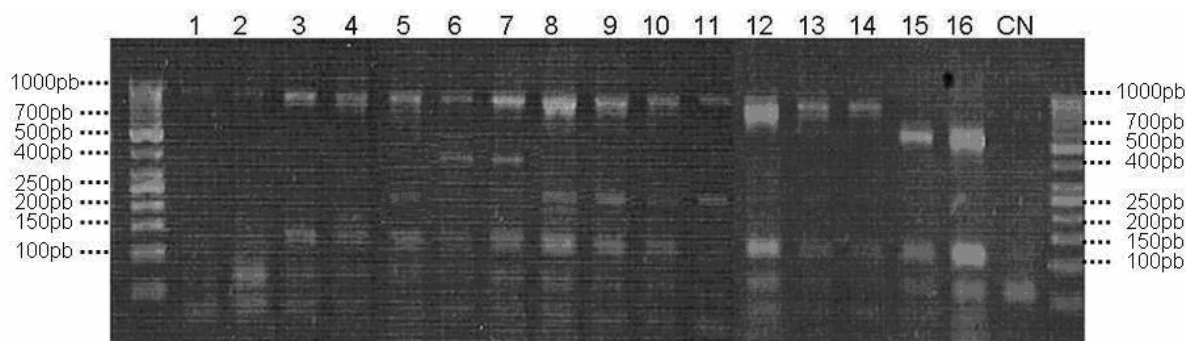


Figura 19. "Fingerprint" das espécies 1,2) *R. brethesi* CTA 222; 3,4) *R. nasutus* CTA 53; 5) *R. neglectus* CTA 67; 6,7) *R. pictipes* CTA 71; 8,9) *R. prolixus* CTA 76; 10) *R. prolixus* CTA 79; 11) *R. robustus* CTA 85; 12) *R. nasutus* CTA 211; 13,14) *R. sp* CTA 88; 15,16) *T. brasiliensis* CTA 202, CN) Controle negativo, gerados pela reação com as enzimas *RsaI* + *HaeIII* + *HinfI*. Em gel de agarose 2,0% corado com Nancy 520. Padrão de PM 50pb.

Quadro 3. Fragmentos gerados pela digestão do produto de amplificação do gene 5,8S/ITS-2 com combinação de enzimas de restrição por meio da técnica de PCR-RFLP. Visualizados em gel de agarose 2,0%, comparados com padrão de PM de 100pb.

Enzimas	Espécies	Fragmentos (pb)
HaeIII + HinfI + RsaI	<i>R. brethesi</i>	1000 e 75
	<i>R. sp</i>	900, 800, 140
	<i>R. pictipes</i>	800, 400, 140
	<i>R. neglectus</i>	
	<i>R. prolixus</i>	900, 230, 140
	<i>R. robustus</i>	
	<i>R. nasutus</i>	900, 800, 140
	<i>T. brasiliensis</i>	600, 140

Na tentativa de diferenciar as espécies *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus* foram feitas algumas reações com combinações de enzimas que apresentaram restrição no gene estudado (Figura 20), entretanto essas espécies permaneceram apresentando mesmo padrão de resultado.

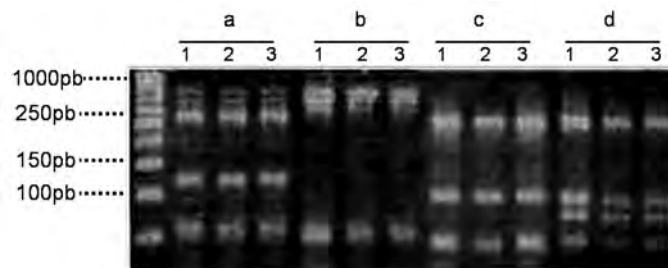


Figura 20. Gel de agarose 2% corado com Nancy 520, padrão de peso molecular de . Amostras 1) *R. prolixus* CTA 79, 2) *R. neglectus* CTA 57 e 3) *R. robustus* CTA 85. a) produto da reação com as enzimas HinfI + HaeIII + RsaI, b) HinfI + HaeIII, c) Mbol + HaeIII, d) Moll + HinfI.

Discussão:

Sequenciamento do gene mitocondrial 16S

A busca de um marcador molecular para as espécies do gênero *Rhodnius* é necessária para sua identificação taxonômica, pois seus caracteres morfológicos são muito semelhantes. Este estudo serviu-se do sequenciamento do gene mitocondrial 16S e da técnica de PCR-RFLP aplicada aos genes 5,8S/ITS-2 do DNA ribossomal como tentativa de realizar essa diferenciação.

O sequenciamento do gene mitocondrial 16S apresentou regiões conservadas entre as espécies, bem como 48 sítios polimórficos (Tab. 6) e foi útil para diferenciação específica das sete espécies de *Rhodnius*. Depositando o produto de sequenciamento desse gene no “software” Mega 4 foi traçada a filogenia entre as espécies estudadas por meio dos parâmetros analíticos de Neighbor Joining, Máxima Parcimônia e UPGMA (Figuras 10, 12 e 14).

O dendograma obtido utilizando-se o método de Neighbor-Joining foi o mais informativo quanto ao grau de parentesco das espécies (Figura 10). Entretanto a análise com o parâmetro UPGMA, uma estatística mais simples que avalia as espécies por pares, foi muito importante para realizar uma comparação entre as duas metodologias estudadas (Figuras 14 e 17).

Os sequenciamentos do gene 16S depositados no Gen Bank foram utilizados nesse estudo para dar suporte às análises realizadas. Os produtos de sequenciamento foram alinhados juntos (Figura 9) e, por meio do “software” MEGA 4, foram feitos dendogramas com os mesmos parâmetros analíticos utilizados anteriormente, resultando nas figuras 11, 13 e 15. Pode-se observar que a inclusão dessas amostras obtidas do GenBank seguiu a resposta obtida somente com as amostras em estudo, o que veio a confirmar os resultados obtidos.

O presente estudo contribui com inclusão do sequenciamento do gene 16S mitocondrial de *R. sp* dentre as amostras do gene 16S que já haviam sido sequenciadas. Muito

embora que o fragmento do gene 16S já tenha sido sequenciado para as espécies *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. pictipes*, os resultados obtidos confirmaram o status taxonômicos dos exemplares oriundos das colônias do Insetário de Triatominae de Araraquara.

A análise do sequenciamento do gene 16S para *R. brethesi* CTA 222 o aproximou filogeneticamente de *R. pictipes*, que juntos formaram um clado separado das demais espécies. Essa diferenciação de *R. brethesi* e *R. pictipes* também foi evidenciada por meio do sequenciamento do gene citocromo b mitocondrial realizados por Monteiro et al., 2000 e Lyman et al. 1999.

O processo de descrição da nova espécie *R. sp* tem se pautado na análise comparativa de critérios morfológicos e de biologia molecular com *R. robustus*, espécies próximas. O sequenciamento do gene 16S para essas espécies também confirmou a proximidade entre elas.

Técnica de PCR-RFLP

Apesar da técnica de PCR-RFLP não ter sido eficaz para distinção de três espécies entre as estudadas, foi mais barata, rápida e simples que o sequenciamento do gene mitocondrial 16S. Com ela foi possível diferenciar *R. brethesi*, *R. sp*, *R. pictipes* e *R. nasutus*, das espécies *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*, espécies muito próximas filogeneticamente (Figura 17).

A aplicação do método analítico UPGMA em ambas metodologias estudadas possibilitou a comparação dos dois dendogramas (Figuras 14 e 17), que apresentaram resultados semelhantes, exceto para *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus* permaneceram juntas ao serem analisadas por PCR-RFLP.

Naegele et al. 2006, aplicaram a metodologia de PCR-RFLP e ao utilizarem as enzimas BstUI, HhaI, MboI e RsaI conseguiram distinguir *R. stali*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e

R. domesticus. O presente trabalho complementou esse estudo acrescentando *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. sp* e *R. brethesi*.

A utilização conjunta das enzimas HinfI, HaeIII e RsaI em única reação apresentou resultado inferior ao estudo efetuado separadamente com cada uma das quatro enzimas utilizadas neste estudo, pois além de não distinguir as espécies *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*, também não distinguiram *R. nasutus* de *R. sp* (Figura 19 e Quadro 3).

Foi realizada tentativa de combinar algumas enzimas em uma única reação com as amostras de *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus* a fim de diferenciá-las (Quadro 1), no entanto essas amostras permaneceram apresentando mesmo padrão de resultado (Figura 20). Novos testes poderiam ser feitos com combinações de enzimas para buscar a diferenciação dessas três espécies, e para isso também poderia ser feito o sequenciamento dos genes 5,8S/ITS-2.

Ao avaliar os resultados obtidos pelos dois métodos empregados neste estudo confirmou-se a validade da utilização da PCR-RFLP para identificação de *R. brethesi*, *R. nasutus*, *R. pictipes* e *R. sp*, uma vez que o seqüenciamento do gene 16S já é um marcador estabelecido para o gênero *Rhodnius*. Desse modo confirma-se também o trabalho executado anteriormente por Naegele et al. 2006, que por meio de PCR-RFLP distinguiram *R. stali*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. domesticus*.

Conclusões:

Sequenciamento do gene 16S

- Apresentou 48 sítios polimórficos;
- Foi eficaz na distinção das espécies;
- Confirmou o status taxonômico dos exemplares oriundos das colônias do Insetário de Triatominae de Araraquara;
- Deu suporte ao estudo das espécies pela metodologia de PCR-RFLP ;
- Aproximou filogeneticamente *R.sp* de *R. robustus*;
- Custo elevado e dificuldade para obter o sequenciamento.

PCR-RFLP

- Bom resultado para diferenciação das espécies de *Rhodnius* estudadas com exceção de *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus*;
- Confirmou e complementou o estudo de Naegele et al. 2006, acrescentando as espécies *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. sp* e *R. brethesi*;
- Diferenciou *R.sp* de *R. robustus*, espécies próximas;
- Custo reduzido e técnica mais simples que o sequenciamento.

Referências Bibliográficas:

Abad-Franch, F., Monteiro, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 77, 437-454, 2005.

Almeida, C.E. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera - Reduviidae - Triatominae): estudos biológicos, ecológicos e isoenzimáticos associados à potencialidade vetorial no Rio Grande do Sul, Brasil. Rio de Janeiro, 2000. (Dissertação de Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz).

Avise, J.A.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Berningham, E.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. & Saunders, N.C. Intraspecific phylo-geography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522, 1987.

Amato Neto, V. and Pasternak, J. Centenário da doença de Chagas. *Rev. Saúde Pública*. 3, 381-382, 2009.

Andrade, S.G., Magalhães, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*. 31, 27-35, 1997.

Argolo, A.M.; Feliz, M., Pacheco, R., Costa, J. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora Ltda. Rio de Janeiro, 63, 2008.

Bargues, M. D. & Mas-Coma, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18S rDNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 569-577, 1997.

Bargues, M. D.; Marcilla, A.; Dujardin, J, P. & Mas-Coma, S. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 96, 159-164, 2002.

Brisse, S; Barnabé, C; Tibayrenc, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*. 30, 35 – 44, 2000.

Barrett, T.V. Current research on Amazonian Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83 (Suppl. I): 441-447, 1988.

BARRETTO, M. P., 1967. Estudos sobre reservatórios e vetores naturais do *Trypanosoma cruzi*. Contribuição para o estudo dos focos naturais da Tripanosomose Americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1: 23-35.

Bérenger & Blanchet. A new species of the gênero *Panstrogylus* from French Guiana (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2007.

Boulos, Marcos. Doenças Tropicais no Brasil: situação atual e perspectivas. *Revista Ciência & Ambiente*. Universidade Federal de Santa Maria. Vol. 1. Santa Maria. Jul 1990.

Camargo, Erney F. Plessmann de. *Doenças tropicais*. 22 (64): 95-110, 2008.

- Carvalho, M. F. P.; Ribeiro, F. A. Q. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 68, 2002.
- Chagas, C.J.R. 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, 1909.
- Chagas, C. O mal de Chagas. *Arch Soc Med Cir S Paulo.* 3: 34-66, 1912.
- Coleman, A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19, 370-75, 2003.
- Costa, J., C. E. Almeida, E. M. Dotson, A. Lins, M. Vinhaes, A. C. Silveira, and C. B. Beard. 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98
- Costa, J.; Argolo, A. & Felix, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa.* 1385, 47-58, 2006.
- Costa, J. & Felix, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102, 87-90, 2007.
- Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed-a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 113-122.
- Coura, J.R, Dias, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Jul,104 Suppl 1:31-40, 2009.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature,* 2010 Jun 456, 6-7.
- 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.* 31, 4, 1998.
- Dias, J.C.P.; Prata, A. & Schofield, C. J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 669-678, 2002.
- Dias, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cadernos de Saúde Pública.* 23, 2007a.
- Dias, J.C.P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 102(Suppl. I): 11-18, 2007b.
- Dias JCP, Macedo VO 2005. Doença de Chagas. In JR Coura. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.557-593.
- Diotaiuti L, Paula OR, Falcão PL, Dias JCP 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.

Deane, M. P.; Lenzi, H. L. ; Jansen, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79, 513-515, 1984.

De Geer C. (1773) *Memoires pour servir a l'histoire des insectes*. Tome III. Pierrer Hesselberg, Stockholm. 696pp.

Ferreira-Filho JCR, Costa PI, Buainain A, Rosa JA. Soropositividade para doença de Chagas entre doadores de sangue em Araraquara, Estado de São Paulo, no período de 2004 a 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(1):110-112, jan-fev, 2011

Forero, D., Weirauch, C. & Baena, M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830) *Zootaxa*. 670, 1-12, 2004.

Fraiha Neto H, Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN 1995. Doença de Chagas - Endêmica na Amazônia? *An Acad Med Pará* 6: 53-57.

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*. 202, 1-36, 2003.

García B.A.; Powell J.R.; Phylogeny of Species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Journal of Medical Entomology*. 35, 232- 238, 1998.

Galvão, C. & Ângulo, V.M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa*. 1241, 61-68, 2006.

Gasser, R. B., And H. Hoste. Genetic markers for closely related parasitic nematodes. *Molecular and Cellular Probes* 9, 315-320, 1996.

Hamza, A.A., Eisa, E.G. I. and Mahdi A.A. Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab). *African Journal of Biotechnology*. 8, 3399-3404, 2009.

Harry, M. Use of the median process of the pygophore in the identification of *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87, 277-82, 1993.

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

Hillis, D.M.; Dixon, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.*, v. 66, p. 411-453, 1991.

Hoare C.A., 1972. A zoological monograph. The Trypanosomes of Mammals. Blackwell scientific publications, Oxford and Edinburgh.

Hypsa, V. et al. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 23, 447-457, 2002.

- Junqueira, C. V.; Degraeve, W.; Brandão, A. Minicircule organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends. Parasitol.*, v. 21(6), p. 270-2, 2005.
- Jurberg, J., Lent, H. & Galvão, C. The male genitalia and its importance in taxonomy. Genitália dos machos e sua importância em Taxonomia. In Atlas of Chagas' disease vectors in the Américas. (R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent, eds). Editora Fiocruz. Rio de Janeiro. 85-106, 1998.
- Jurberg, J., Rocha, Galvão, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota. Neotrop.* 9, 0-0, 2009.
- Kumar, S.; Tamura, K., Nei, M. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* 5, 150-163, 2005.
- Kumas, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics.* 9, 299-306, 2008.
- Larrousse, F. Etude biologique et systématique du genre *Rhodnius* Stal (Hémiptères, Reduviidae). *Annales de Parasitologie* 5, 63-88, 1927.
- Lent, H. & Jurberg, J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859 com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Brasil. Biol.* 29, 487-560, 1969.
- Lent, H., Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 520-529, 1979.
- Lent H. Comentários sobre o gênero *Rhodnius* Stal com descrição de uma nova espécie do Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira da Biologia* 14, 237-247, 1954.
- Lehmann, T.; Blackston, C.R.; Besansky, N. J.; Escalante, A.A.; Collins, F.H.; Hawley, W. A. The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for *Anopheles gambiae* in Kenya: the mtDNA perspective. *J. Heredity.* 91, 165-168, 2000.
- 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.
- 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.* 60, 377-386, 1999.
- Maia, F. S.; Marcili A.; Lima L.; Cavazzana M. Jr.; Ortiz P.A.; Campaner M.; Takeda G.F.; Paiva F.; Nunes V.L.; Camargo E.P.; Teixeira M.M. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Trop.* 109, 199-207, 2009.
- Marcilla, A. et al. 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, 2001.

- Marcilla, A. , Bargues, M.D. , Abad-Franch F., Panzera, F. , Carcavallo, R.U., Noireau, F., Galvão, C., Jurberg, J., Miles, M.A., Dujardin, J.P., Mascoma, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* 1, 225-235, 2002.
- Marcondes CB. 2001. *Entomologia Médica e Veterinária*. Ed. Atheneu, São Paulo. 433.
- Martínez, E; Chávez, T.; Sossa, D.; Aranda, R.; Vargas, B.; Vidaurre, P. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación em Salud y Desarrollo*. 3, 2007.
- Matta A. Um novo reduvídeo do Amazonas, *Rhodnius brethesi* n. sp. *Amazonas Med* 2, 93-94, 1919.
- Meyer, D. Análise filogenética de sequências de DNA. In: Amorim, D.S. (Ed.) *Elementos básicos de sistemática e filoenética*. 2. Ed. Ribeirão Preto: Holos & Sociedade Brasileira de Entomologia. 186-212, 1997.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg. Apr.* 62,460-5, 2000.
- Monteiro, F. A.; Barrett T. V.; Fitzpatrick S.; Cordon-Rosales C.; Feliciangeli, D. And Beard, C. B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*. 12, 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32, 46-56, 2004.
- Mueller, U.G., & Wolfenbarger, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*. 14, 389–394, 1999.
- Noireau, F.; Diosque, P., Jansen, A.M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*. 40, 26, 2009.
- 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*, 20, 353-357, 2006.
- Paskewitz, S.M.; Wesson, D.M.; Collins, F.H. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Mol. Biol.*, v. 2, n. 4, p. 247- 257, 1993.
- Pinto AYN, Valente SAS, Valente VC, Ferreira-Junior AG, Coura JR 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 602-614.

- Poinar, G. Jr. *Triatoma dominicana* sp. n (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and *Tripanosoma antiquus* sp. n. (Stercovaria, Trypanosomatidae). The first fossil evidence of a triatominae-tripanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2005
- Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A. Chagas disease. *The Lancet.* 375, 1388-1402, 2010.
- Rosa, J. A.; de Freitas, S. C. M.; Malara, F.F.; Rocha, C. S. Morphometry and morphology of the antennae of *Panstrongylus megistus* Burmeister, *Rhodnius neglectus* Lent, *Rhodnius prolixus* Stal and *Triatoma vitticeps* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*, v.39, p.214-220, 2010.
- Sandoval, C. M.; Pabón, E., Jurberg, J. & Galvão, C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombia north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa.* 1443, 55-64, 2007.
- Schofield, C.J., Galvão, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica.* 110, 88–100, 2009.
- Schmunis G. A.. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 102(Suppl. I): 75-85, 2007.
- Schofield, C. J., Galvão, C.J. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110, 88–100, 2009.
- Soares, R. P. P.; Barbosa, S. E.; Dujardin J. P.; Schofield C. J.; Siqueira; A. M.; Diotaiuti, L. Characterization of *Rhodnius neglectus* from Two Regions of Brazil Using Isoenzymes, Genitalia Morphology and Morphometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 94, 161-166, 1999.
- Souto, R.P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.83, p.141-152, 1996.
- Stal C. Monographie der Gattung *Conorhinus* und Verwandten. *Berliner Entomologische Zeitschrift.* 3, 99-117, 1859.
- Stal C. Enumeratio Hemipterorum. Pars 2. Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar. 10, 1-159, 1872.
- Steindel, M.; Pacheco, L.K.; Scholl, D.; Soares, M.; Moraes, M.H.; Eger, I.; Kosmann, C.; Sincero, T.C.M.; Stoco, P.H.; Murta, S.M.F.; Pinto, C.J.C. & 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. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008.
- Stothard,J.R., Yamamoto,Y., Cherchi,A., Garcia,A.L.,Valente,S.A.S., Schofield,C.J. and Miles,M.A. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation within triatomine bugs (Hemiptera:Reduviidae) using single strand. *Bull. Entomol. Res.* 88, 553-560, 1998.

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.

Tuoto, E. A. "Doença de Chagas e os Epônimos Médicos." In: *História da Medicina by Dr Elvio A Tuoto* (Internet). Brasil, 2006. Consulta em [16 de maio de 2011]. Disponível em: <http://historyofmedicine.blogspot.com/2006/01/epnimo-doena-de-chagas-eponym-chagas.html>

Valente, S.A.S.; Valente, V.C. & Frahia-Neto, H. - Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas' disease in the Brazilian Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94 (suppl.1): 395-398, 1999.

Ventura, M.; Elli, M.; Reniero, R.; Zink, R. Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiol Ecol. 36, 113-121, 2001.

Vinhaes, M.C.; Dias, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. Cadernos de Saúde Pública 16. Rio de Janeiro: Fiocruz. 7-12, 2000.

Zingales, B. et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104, 1051 – 1054, 2009.

WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000 : Brasilia, Brazil) Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee.

WHO. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina. abril de 2005, atualizado em julho de 2007. World Health Organization, 96, 2007.

www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html, Acesso em 14/12/2010.