



UNESP
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



CLÁUDIA SOLANO ROCHA



ARARAQUARA
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

"Variabilidade genética de três colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), (Hemiptera, Reduviidae), oriundas do Estado do Rio Grande do Sul, avaliadas por meio do seqüenciamento de genes do DNA mitocondrial e ribossomal"

CLÁUDIA SOLANO ROCHA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

**ARARAQUARA
2009**

Ficha Catalográfica

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

R672v Rocha, Cláudia Solano
Variabilidade genética de três colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), (Hemíptera, Reduviidae), oriundas do Estado do Rio Grande do Sul, avaliadas por meio do sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e ribossomal / Cláudia Solano Rocha. – Araraquara, 2009. 94 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.Triatoma rubrovaria. 2.Citocromo B. I.Rosa, João Aristeu da, orient..II.Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e Biologia Molecular de Parasitos e Vetores do Departamento de Ciências Biológicas, pertencentes à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, com apoio da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por meio da concessão de uma bolsa de Mestrado e auxílio à pesquisa FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – processo 00072/08).

À Deus que sempre está ao meu lado, iluminando meu caminho

*Aos meus pais, Solange e Claudinei, por terem
aberto mão de seus sonhos pelos meus;
Ao Eduardo, pelo amor, incentivo e compreensão
durante este caminho*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, meu orientador, por todo apoio, incentivo e confiança em mim depositados desde os tempos da Iniciação Científica, fundamentais para meu crescimento científico, profissional e pessoal;
- À Profa. Dr. Regina Maria Barretto Cicarelli, pela parceria e por gentilmente ter me recebido em seu Laboratório;
- À Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas e à Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha, da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, ambas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara pelo apoio e incentivo;
- Às doutorandas Joyce Aparecida Martins e Greiciane Gaburro Paneto por todo auxílio e tempo despendidos para que fosse possível realizar o seqüenciamento;
- À Dra. Daniela Luz Ambrósio e ao doutorando Marco Túlio Alves da Silva pelo auxílio, sugestões, confiança e amizade que foram importantes para que este trabalho fosse desenvolvido;
- À Maria Zenaide Tita Fernandes pelo carinho, dedicação e amizade dedicados a mim e ao Laboratório de Parasitologia;

- À Isabel Martinez da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, pela colaboração e amizade;
- Ao Dr. Antonio Leite Ruas-Neto, Dra. Sirlei Famer, Fernanda de Mello, Maria Amélia Torres, Juvenal Augusto Vieira, Cledir Ribeiro, Carlos Moisés Araújo, Paulino Signes Benites, João Medeiros Soares e Mario Brito de Oliveira, da Secretaria de Saúde do Estado Rio Grande do Sul, que colaboram na coleta dos Triatomíneos utilizados neste estudo;
- Às funcionárias Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornelas, da Seção de Pós-Graduação pela amizade, gentileza e pronto atendimento;
- Às amigas dos tempos da Graduação, Ana Paula Iwai e Juliana Miqueleto pela maravilhosa amizade e acolhimento nos momentos mais difíceis;
- Aos amigos do Laboratório Aline, Júlio, Renata e Sueli pela amizade, apoio, incentivo e convivência, que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho;

A todos, muito obrigada!

*“A ignorância afirma ou nega com veemência, ao
passo que a ciência duvida”*

Voltaire

1694-1778

Filósofo francês

ÍNDICE

	Página
Lista de Tabelas.....	I
Lista de Quadros.....	II
Lista de Figuras.....	III
Abreviaturas e Siglas	V
Resumo	VII
Abstract	VIII
Revisão Bibliográfica	1
1. A doença de Chagas	1
2. Insetos vetores da doença de Chagas – Triatomíneos	3
3. Sistemática e métodos moleculares	5
4. Justificativa	9
5. Objetivos	10
6. Metodologia	11
6.1 – Insetos	11
6.2 – Extração e quantificação da concentração do DNA genômico	12
6.3 – Amplificação de DNA por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	13
6.4 – Iniciadores (<i>Primers</i>).....	15
6.5 – Purificação dos fragmentos amplificados	15
6.6 – Seqüenciamento	16
6.7 – Análise dos dados	17
7. Resultados e Discussão	18
8. Conclusões	50
9. Referências Bibliográficas	51
10. Anexo I – Artigo Submetido.....	61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Médias e desvios-padrão das mensurações (mm) do comprimento de cabeça, tórax, abdome, distância interocular (DIO), distância anteocular (DAO), distância pós-ocular (DPO), diâmetro dos olhos (DO), 1º, 2º. e 3º. segmentos da probóscida (Prob1, Prob 2 e Prob 3) de adultos machos de três populações de *T. rubrovaria* . $P < 0,0001$ = extremamente significativo; $P < 0,05$ = significativo; $P > 0,05$ = Não significativo **47**

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Sítios variáveis do 16S encontrados para três populações de *T. rubrovaria*. **16**
- Quadro 2:** Sítios variáveis do Citocromo B encontrados para três populações de *T. rubrovaria*. **35**
- Quadro 3:** Alinhamento das seqüências de 120 aminoácidos do gene mitocondrial do Citocromo B observados em *T. rubrovaria* e *T. sherlocki*. **36**
- Quadro 4:** Sítios variáveis do D2 encontrados para três populações de *T. rubrovaria*. **45**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Diagrama ilustrando a organização do DNA ribossomal (rDNA) no genoma eucariótico típico e seu RNA primário transcrito. Adaptado de Coleman, 2003	6
Figura 2:	A – <i>T. rubrovaria</i> QI, B – <i>T. rubrovaria</i> QII, C – <i>T. rubrovaria</i> CS	11
Figura 3:	Eletroforese da extração do DNAg realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de 10 exemplares de <i>T. rubrovaria</i> oriundos da colônia de Quaraí (RS) – colônia QI.	18
Figura 4:	Eletroforese da extração do DNAg realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de 10 exemplares de <i>T. rubrovaria</i> oriundos da colônia de Quaraí (RS) – colônia QII.	18
Figura 5:	Eletroforese da extração do DNAg realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de 10 exemplares de <i>T. rubrovaria</i> oriundos da colônia de Caçapava do Sul (RS) – colônia CS.	19
Figura 6:	Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (16S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de <i>T. rubrovaria</i> da colônia QI (Quaraí- RS).	20
Figura 7:	Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (16S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de <i>T. rubrovaria</i> da colônia QII (Quaraí- RS).	20
Figura 8:	Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (16S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de <i>T. rubrovaria</i> da colônia CS (Caçapava do Sul- RS).	20
Figura 9:	Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do DNA mitocondrial de exemplares de <i>T. rubrovaria</i> colônia QII.	21
Figura 10:	Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do DNA mitocondrial de exemplares de <i>T. rubrovaria</i> colônia QI.	22
Figura 11:	Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do DNA mitocondrial de exemplares de <i>T. rubrovaria</i> colônia CS.	23
Figura 12:	Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial de <i>T. rubrovaria</i> (colônias QI, QII e CS), <i>T. rubrovaria</i> (CTA117A, CTA 117C e CTA108A) <i>T. circummaculata</i> , <i>T. platensis</i> e <i>T. sherlocki</i> .	24
Figura 13:	Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do Citocromo B realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de <i>T. rubrovaria</i> da colônia QI (Quaraí- RS).	27
Figura 14:	Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do Citocromo B realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de <i>T. rubrovaria</i> da colônia QII (Quaraí- RS).	27

- Figura 15:** Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do Citocromo B realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia CS (Caçapava do Sul - RS). **28**
- Figura 16:** Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QII. **29**
- Figura 17:** Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QI. **30**
- Figura 18:** Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de exemplares de *T. rubrovaria* colônia CS. **31**
- Figura 19:** Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de *T. rubrovaria* (colônias QI, QII e CS) e *T. sherlocki*. (Grupo externo) **33**
- Figura 20:** Eletroforese da amplificação do gene nuclear da grande subunidade ribossomal D2 (28S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QI (Quaraí- RS). **38**
- Figura 21:** Eletroforese da amplificação do gene nuclear da grande subunidade ribossomal D2 (28S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QII (Quaraí- RS). **38**
- Figura 22:** Eletroforese da amplificação do gene nuclear da grande subunidade ribossomal D2 (28S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia CS (Caçapava do Sul - RS). **39**
- Figura 23:** Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S), observados de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QII. **40**
- Figura 24:** Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S), observados de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QI. **41**
- Figura 25:** Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S), observados de exemplares de *T. rubrovaria* colônia CS. **42**
- Figura 26:** Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S) de *T. rubrovaria* (colônias QI, QII e CS). **43**
- Figura 27:** Padrões cromáticos de pronoto de *T. rubrovaria*. A = pronoto preto uniforme; B = vista lateral da cabeça; C e D = padrões cromáticos de pronotos; E= vista dorsal da cabeça; F – J = padrões cromáticos de pronotos. Lent & Wygodzisky, 1979. **46**
- Figura 28:** Padrões de mensuração de segmentos da cabeça. CC = comprimento da cabeça; PO = distância pós-ocular; AO = distância anteocular; DO = diâmetro dos olhos; Prob 1, Prob 2 e Prob 3 = 1º, 2º. e 3º. segmentos da probóscida. DUJARDIN et al., 1999, modificado. **48**

ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius

CS: Caçapava do Sul

Cyt B: citocromo B

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ethylene Diamine Tetracetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ES: Encruzilhada do Sul

ETS: espaçador externo transcrito

g: força da gravidade

DNAg: DNA genômico

H₂O: água

ITS: espaçador interno transcrito

Kb: Kilobase (1000 pares de bases)

LSU: subunidade maior do gene do RNA ribossomal

M: molar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

mtDNA: DNA mitocondrial

mtlsubr: grande subunidade ribossomal do genoma mitocondrial

μL: microlitro

μM: micromolar

NaCl: Cloreto de sódio

ng: nanograma

nm: nanômetro

pb: pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

QI : Quaraí I

QII: Quaraí II

PM: Marcador de peso molecular

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SSU: subunidade menor do gene do RNA ribossomal

Tris-HCl: Tris-Ácido clorídrico

U: unidade

UV: luz ultravioleta

V: Volts

RESUMO

Atualmente são admitidas 143 espécies da subfamília Triatominae que estão agrupadas em 18 gêneros e seis tribos. Essa classificação baseia-se principalmente em características morfológicas. Dentre essas espécies temos *Triatoma rubrovaria*, que pode ser encontrado no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), Uruguai e em algumas regiões da Argentina. Algumas espécies de Triatominae apresentam coloração e características morfológicas semelhantes, o que dificulta a identificação dos exemplares. Ferramentas como a morfometria, citogenética, retrocruzamentos e técnicas de biologia molecular são metodologias importantes para a identificação dessa subfamília. Estudos morfométricos prévios realizados com três populações de *T. rubrovaria* mantidas no Insetário de Triatomíneos do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas revelaram a existência de diferenças morfométricas estatisticamente significativas entre a colônia de Caçapava do Sul (CS) e as duas colônias de Quaraí (QI e QII). Diferenças no padrão de cor do pronoto entre as três populações também foram observadas. A fim de avaliar a variabilidade genética dessas populações, analisaram-se as seqüências nucleotídicas do Citocromo B (Cyt B) e 16S, pertencentes ao DNA mitocondrial e o 28S, ao DNA nuclear. Dentre os marcadores utilizados, o Cyt B apresentou maior variabilidade, seguido do 28S e 16S, respectivamente. Devido ao seu maior polimorfismo o Cyt B mostrou-se um marcador eficaz para estudos de variabilidades populacionais.

Palavras-Chave: *Triatoma rubrovaria*, Citocromo B, 16S, 28S, seqüenciamento, variabilidade populacional.

ABSTRACT

Currently 143 species of the subfamily Triatominae, grouped into 16 genera and 6 tribes are recognized. This classification is mainly based on morphological characteristics. These species include *Triatoma rubrovaria*, which can be found in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), Uruguay and some regions of Argentina. Some species of Triatominae have similar color and morphological characteristics, which complicates the identification of specimens. Morphometry, cytogenetics, backcrossing and molecular biology techniques are important methods for the identification of this subfamily. Previous morphometric studies carried out on three populations of *T. rubrovaria* maintained in the Insetário de Triatomíneos do Laboratório de Parasitologia of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas have revealed the existence of statistically significant morphometric differences among the colony from Caçapava do Sul (CS) and the two colonies from Quaraí (QI and QII). Differences were also observed in the color patterns of the pronotum among the three populations. The sequences of Cytochrome B (Cyt B) and 16S, belonging to the mitochondrial DNA and 28S, the nuclear DNA, were analyzed to assess the genetic variety of these populations. The Cyt B showed the greatest variability, followed by 28S and 16S. It was concluded that Cyt B is the best marker for effective studies of population variability by virtue of its greater polymorphism.

Keywords: *Triatoma rubrovaria*, Cytochrome B, 16S, 28S, sequencing, populational variability

Revisão Bibliográfica

1. Doença de Chagas

A “Nova Tripanozomíase Humana” descrita por Chagas (1909) e que posteriormente foi denominada doença de Chagas continua sendo um problema de Saúde Pública, tanto que foi a terceira causa de óbitos (13,5%) dentre as enfermidades infecciosas e parasitárias, com registro de cerca 6000 mortes/ano entre 1980/1990 (SILVEIRA & RESENDE, 1994; FNS, 1999; TRAVASSOS-CARVALHO, 2000).

Estima-se que sejam 28 milhões os indivíduos infectados nas Américas Central e do Sul e a incidência de novos casos caiu dos 700.000 nos anos 90 para 41.200 em 2006 (WHO, 2007).

A transmissão dessa enfermidade ocorre principalmente por meio das fezes de triatomíneos contaminadas com o protozoário *Trypanosoma cruzi*, mas também por transfusão sanguínea, congenitamente, acidentes laboratoriais, transplantes e ingestão de alimentos contaminados, como por exemplo, caldo de cana e de açaí (LEWINSOHN, 2005).

Em 2005, foram relatados às autoridades de saúde do Estado de Santa Catarina 24 casos (sendo três fatais) de febre hemorrágica, todos associados à ingestão de caldo de cana (MS, 2008a). Estudos posteriores constataram a contaminação do caldo por *T. cruzi*, o que caracteriza a forma aguda da doença de Chagas e justifica as reações observadas (STEINDEL et al., 2008). Na região Norte do Brasil, entre 2005 e 2007, foi registrado um surto da transmissão de *T. cruzi* pelo consumo do suco de açaí, constando mais de 100 ocorrências e oito óbitos (MS, 2008b).

À época da descrição da doença, Chagas já se referia à importância da melhoria das condições de moradia para o controle dos triatomíneos no ambiente doméstico, uma vez que os mesmos vivem em frestas e rachaduras das paredes das casas. Antes da II Guerra Mundial havia poucas técnicas para o combate do vetor em ambiente doméstico. No início, o combate aos triatomíneos era realizado com querosene e na década de 40, com o advento dos inseticidas sintéticos, o controle ao vetor tornou-se melhor sucedido. As paredes das casas eram borrifadas com organoclorados e houve diminuição significativa das populações domiciliares. Nos anos 80 os organoclorados foram substituídos por piretróides devido à sua maior eficiência (DIAS *et al.*, 2000; 2002).

A diminuição significativa da infestação domiciliar por triatomíneos foi acompanhada por uma rápida redução dos casos agudos da doença, fato esse documentado por estudos realizados nos Estados de Minas Gerais (Dias, 1982) e de São Paulo (Souza *et al.*, 1984). Quadros similares de decréscimo também foram verificados em outros países do Cone Sul, em extensas áreas da Argentina e Paraguai e no sul da Bolívia (VINHAES, 2000).

Paralelamente, ao controle do vetor observou-se redução da transmissão por outras vias, entre as quais por meio de doadores de sangue e congenitamente. (DIAS, 2000).

Contudo, estudos sobre o agente etiológico, assim como sobre os vetores continuam necessários, uma vez que a erradicação do *T. cruzi*, assim como dos seus vetores é praticamente impossível com os conhecimentos atuais. Corrobora essa afirmação o que se tem observado no Estado de São Paulo, onde a transmissão vetorial da doença de Chagas está controlada desde 1965, no entanto, ainda persiste a possibilidade de transmissão natural, pois os vetores podem ser encontrados, mesmo em matas residuais, conforme observações trimestrais feitas por Barata e colaboradores no município de Araraquara (PINTO, 2000) no período de 1979 a 2007.

2. Insetos vetores da doença de Chagas – Triatomíneos

Na monografia publicada em 1979 Lent e Wygodzinsky referem todas as espécies válidas de Triatominae, perfazendo um total de 110 espécies, estudadas de maneira detalhada, incluindo observações sobre os ciclos de vida e habitats na natureza, além da distribuição por diferentes regiões e países, assim como as informações quanto à infestação pelo parasita *T. cruzi* na natureza e em laboratório (LENT, 1999). As principais espécies vetoradas da doença estão distribuídas desde o sul dos Estados Unidos à Argentina, entre as latitudes 41°N e 46°S (DIAS, 2000).

Desde então, novos gêneros e espécies foram descritos. Atualmente são admitidas 143 espécies da subfamília Triatominae que são agrupadas em 18 gêneros e seis tribos. O gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 69 espécies descritas, as quais estão agrupadas em nove complexos. A classificação feita por Lent & Wygodzinsky (1979), bem como as demais feitas posteriormente por outros autores baseiam-se principalmente em características morfológicas (SCHOFIELD, 2000; GALVÃO et al., 2003; FORERO et al., 2004; COSTA et al., 2006; GALVÃO & ANGULO, 2006; COSTA & FELIX, 2007; SANDOVAL et al., 2007).

Dentre essas espécies inclui-se *Triatoma rubrovaria*, que pode ser encontrada no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil, Misiones, Corrientes e Entre Rios na Argentina e em todas as regiões do Uruguai (ROSA et al., 2000). *T. rubrovaria* era considerada silvestre e de importância secundária, mas provavelmente devido às alterações ambientais, essa espécie está se domiciliando (SILVEIRA, 1983) e em muitos municípios do Rio Grande do Sul podem ser capturados elevados números de exemplares (ROSA et al., 2000; RUAS-NETO et al., 2002).

Triatoma rubrovaria possui hábitos rupestres e é encontrado em buracos e fendas de locais pedregosos, onde predominam rochas com características graníticas ou areníticas, alimentando-se do sangue de vários vertebrados principalmente roedores, mantendo assim o ciclo silvestre da tripanossomíase americana (ROSA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002; MARTINS et al., 2006).

Dados obtidos pela Fundação Nacional de Saúde, no período de 1975 a 1997, indicam um aumento de invasões domiciliares e peridomiciliares do *T. rubrovaria* no Rio Grande do Sul, sendo a taxa de infecção natural dos exemplares capturados de 1,02% (DIAS, 2000; SILVEIRA & VINHAES, 1998).

Nessa perspectiva Rosa et al., (1999, 2000a, 2000b) estudaram por microscopia eletrônica de varredura a morfologia da cabeça de ninfas de 1º e 5º estádios, mensuraram os segmentos antenais de ninfas e adultos e avaliaram a morfologia de ovos dessa espécie.

Algumas espécies de Triatominae apresentam coloração e características morfológicas semelhantes, o que dificulta a identificação dos exemplares (LENT et al., 1993).

Garcia et al., (1998), também partilha dessa observação de Lent et al., (1993) e refere que algumas espécies são difíceis de separar taxonomicamente e outras têm seu status taxonômico questionado, sendo assim a morfometria, citogenética, cruzamentos e técnicas de biologia molecular metodologias são úteis no processo de identificação dos Triatominae (MONTEIRO et al., 2001). A biologia molecular fornece informações importantes sobre as relações filogenéticas, uma vez que seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos apresentam um número muito elevado de caracteres e por isso são muito utilizadas para determinar padrões de ramificação na filogenia. (FUTUYMA, 1992).

3. Sistemática e métodos moleculares

Vários marcadores moleculares podem ser explorados para fornecer informações sobre a variabilidade genética dos triatomíneos por meio da detecção de polimorfismo de DNA. Para esse propósito existem várias técnicas disponíveis, tais como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (GASER et al., 1996), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (RODRIGUEZ et al., 2000), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses*) (VENTURA et al., 2001), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (WU et al., 1999, NAEGELE et al., 2006), 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; HYPSE et al., 2002; SAINZ et al., 2004).

O seqüenciamento de determinados genes permite avaliar de forma direta, polimorfismos de DNA, fornecendo informações para inferência filogenética bem como para a avaliação das relações entre organismos e populações. Diferentes porções do DNA mitocondrial e nuclear evoluem em taxas distintas. Regiões que evoluem rapidamente são adequadas para o estudo de organismos muito próximos e aquelas que são conservadas são mais apropriadas para comparação entre táxons mais distantes (ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2005).

O DNA ribossomal (rDNA) é uma região bem conservada e que recentemente mostrou-se como um valioso auxílio para pesquisas de sistemática e filogenia para organismos próximos ou relacionados de forma distante e que não acumulam mutações independentemente – cada unidade de rDNA evolui de forma sincronizada, podendo ser tratada como um único gene. (COLEMAN, 2003; NAEGELE et al., 2006).

Os genes ribossomais estão agrupados como unidades repetitivas em *tandem* e nos insetos apresentam de 100 a 1000 cópias por genoma. Cada unidade consiste de regiões conservadas transcritas, nas quais estão os genes para as subunidades 18S, 5,8S e 28S do ribossomo, dois espaçadores internos ITS-1 e ITS-2, mais um espaçador externo (ETS) (COLEMAN, 2003).

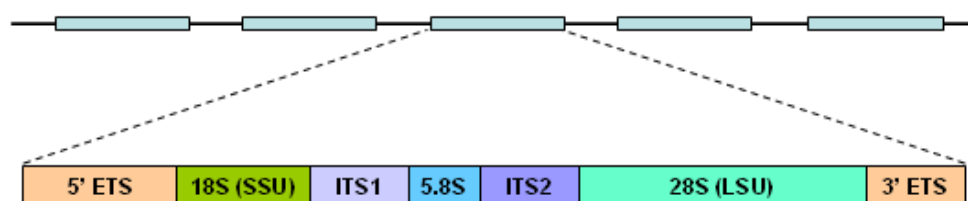


Figura 1: Diagrama ilustrando a organização do DNA ribossomal (rDNA) no genoma eucariótico típico e seu RNA primário transcrito. Adaptado de Coleman, 2003

A região ITS possui uma taxa de substituição nucleotídica mais rápida que a da região 18S, tendo, portanto, uma evolução mais rápida. A taxa de evolução mais lenta da região 18S permite que relações muito antigas, com aproximadamente 100 milhões de anos, sejam estudadas. A região ITS-2 permite estudos de relações mais recentes (cerca de 50 milhões de anos) e é preferencialmente escolhida para estudos de filogenia e como marcador molecular por possuir sub-regiões mais conservadas (BARGUES, 2000; COLEMAN, 2003).

O DNA mitocondrial (mtDNA) corresponde a um genoma relativamente simples, de herança materna e que apresenta taxa de mudança 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/ou estrutura populacional de algumas

espécies de insetos (XIONG & KOCHER, 1991; GASPARISH et al., 1995; ZHANG et al., 1995; BESANSKY et al., 1997; LEHMANN et al., 2000).

Diferentes fragmentos de genes mitocondriais que codificam para citocromo-oxidase I (GARCIA & POWELL, 1998), Citocromo B e a grande subunidade ribossomal foram seqüenciadas e mostraram-se úteis em estudos filogenéticos de gêneros e espécies de *Triatominae* (LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2000).

Garcia et al., (2001) utilizaram fragmentos de genes mitocondriais de 18 espécies de *Triatominae*, sendo 11 pertencentes ao complexo *infestans* e outras sete do mesmo gênero, mas de complexo diferente. Ao analisar os fragmentos de mtDNA de 12S e 16S de genes de rRNA dessas dezoito espécies, bem como o gene da citocromo oxidase I (COI) de nove espécies, foi possível a separação das 18 estudadas em dois grupos, sendo que no grupo do *T. infestans* foi incluído *T. circumaculata*. A inclusão do *T. circumaculata* no complexo *infestans* está em desacordo com a classificação morfológica inicialmente proposta por Lent & Wygodzinsky (1979), mostrando a importância de associar características morfológicas e moleculares para avaliações filogenéticas.

Almeida et al., (2002) estudaram isoenzimas e padrões cromáticos de cinco populações de *T. rubrovaria* coletadas em quatro municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Santana do Livramento, Encruzilhada do Sul, Santiago e Canguçu). Em Santana do Livramento foram coletados exemplares em dois locais distintos e nos demais municípios apenas em um local. As análises de nove *loci* isoenzimáticos foram realizadas a partir de nove sistemas enzimáticos. Os resultados obtidos mostraram que as duas populações coletadas em Santana do Livramento, Canguçu e em Encruzilhada do Sul estão relacionadas fortemente e a coletada em Santiago é a que mais se distancia do grupo. Os autores não encontraram distâncias genéticas significativas entre as duas colônias coletadas em Santana do Livramento. Com os dados obtidos a partir das aloenzimas e distâncias

genéticas para as populações estudadas de *T. rubrovaria*, Almeida *et al.* (2002) não estabeleceram correlação com as distâncias geográficas e sugerem que sejam utilizadas outras técnicas moleculares para confirmar se as populações estudadas realmente eram distintas das demais.

Pacheco *et al.*, (2003) realizaram análise de RAPD e seqüências de subunidades do rDNA (ITS-1, 5,8S e ITS-2), que revelaram diferenças significativas entre duas populações estudadas (Santana do Livramento e Santiago) e que existe heterogeneidade entre as mesmas.

4. Justificativa

Estudos morfométricos prévios revelaram diferenças morfométricas estatisticamente significativas entre as colônias de Caçapava do Sul (CS) e as duas colônias de Quarai (QI e QII). Além das diferenças morfométricas entre as três populações foram observadas diferenças morfológicas verificadas pela variação no padrão de coloração do pronoto. Desse modo pretende-se verificar se a essas diferenças correspondem outras possíveis mudanças no DNA que foram avaliadas por meio do sequenciamento dos genes pertencentes ao DNA mitocondrial e nuclear.

5. Objetivos

5.1 – Objetivo Geral

- Verificar a existência de variabilidade genética no DNA de três populações de *Triatoma rubrovaria*, oriundas do Estado do Rio Grande do Sul.

5.2 – Objetivos Específicos

- Amplificação e seqüenciamento da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial de três populações de *T. rubrovaria*;
- Amplificação e seqüenciamento do gene mitocondrial do citocromo B (Cyt B) de três populações de *T. rubrovaria*;
- Amplificação e seqüenciamento da grande subunidade ribossomal (28S) do genoma nuclear de três populações de *T. rubrovaria*;
- Estudar a variabilidade genética intra e interpopulacionais de três colônias de *T. rubrovaria* provenientes do Estado do Rio Grande do Sul.

6. Material e Métodos

6.1 - Insetos

Foram utilizados exemplares de *Triatoma rubrovaria* oriundos de três colônias, coletadas em Caçapava do Sul (CS) e Quaraí, ambos municípios do Estado do Rio Grande do Sul. Essas colônias são mantidas à temperatura e umidade relativa do ar ambiente, no Insetário de Triatominae do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara. A manutenção das colônias é realizada quinzenalmente oferecendo-se camundongos albinos livres de infecção por *T. cruzi* para a alimentação dos exemplares, por tempo médio de duas horas.

Os espécimes que deram origem à colônia CS foram coletados em abril/1992 em ambiente silvestre no município de Caçapava do Sul/RS (ROSA, 1995). Os espécimes das duas outras colônias foram coletados em fevereiro/2002 (ROSA et al., 2003) no município de Quaraí, Estado do Rio Grande do Sul, em ambiente silvestre. Os espécimes de Quaraí, foram separados em duas colônias, QI e QII. Essa divisão ocorreu devido ao fato de existirem na mesma população exemplares que mostravam pronotos com formas distintas da coloração vermelha.

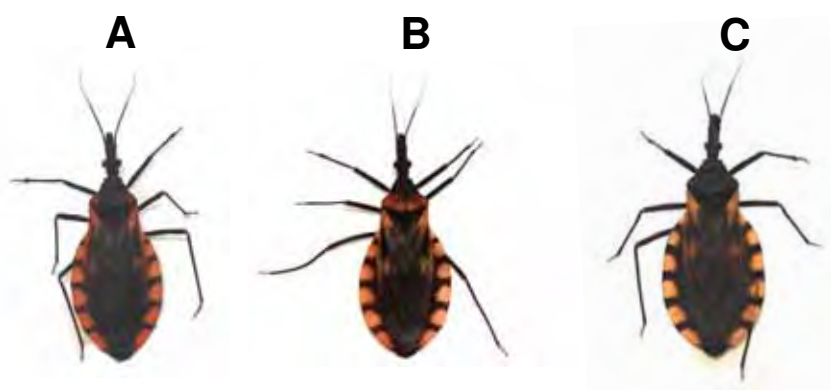


Figura 2. A – *T. rubrovaria* QI, B – *T. rubrovaria* QII, C – *T. rubrovaria* CS

6.2 - Extração e estimativa da concentração do DNA genômico

O tecido de escolha para a extração do DNA genômico foi a musculatura da perna, por esse ser livre de microrganismos contaminantes e simbiontes. Foram excisadas as seis pernas de cada exemplar adulto com auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados. Para evitar contaminantes, as pernas foram previamente higienizadas com álcool 70%.

A extração foi realizada por meio de metodologia proposta por Bargues & Mas-Coma (1997), com as seguintes modificações: a partir de triatomíneos preservados em álcool 70% ou recém sacrificados, as seis pernas foram removidas, procurando sempre retirar a maior quantidade de musculatura possível do tórax, e acondicionadas em eppendorfs de 1,5ml. As pernas foram pré-trituradas com nitrogênio líquido colocado diretamente no eppendorf, com ajuda de uma ponteira. Após a pré-trituração foi adicionado 400µl de solução de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% de SDS a 10%) e novamente triturado com a ajuda de uma ponteira.

A seguir, foi adicionada Proteinase K 500µg/ml, homogeneizada vigorosamente em vortex e incubada em banho-Maria a 55°C por 4 horas. Após o que, novamente homogeneizada em vortex a cada 30 minutos. Então foi adicionado 500µl de fenol:clorofórmio (24:1), centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos e transferida a fase aquosa para outro eppendorf., para então ser adicionar 2 µl de RNase (10µg/100ml) e incubada em banho Maria a 37°C por 1 hora.

Após a incubação com a RNase foi adicionado 400 µl de fenol:clorofórmio (24:1) e centrifugado a 14000 rpm por três minutos, transferindo-se o sobrenadante para eppendorf novo e então adicionado 400µl de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 14000rpm por três minutos. O sobrenadante é transferido para

ependorf novo com 40 µl de acetato de amônio 4M mais 1 mL de etanol absoluto gelado e centrifugado a 4°C 14000rpm por 10 minutos.

A fase aquosa foi descartada e o pellet foi ressuspensionado em 400µl de etanol 70% gelado (etapa de lavagem) e centrifugado a 4°C 14000 rpm por 10 minutos. Todo sobrenadante foi retirado e o pellet é secado no *speedy vacuum*. O DNA precipitado foi ressuspensionado em 100µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6 + 1mM EDTA) e estocado em geladeira.

Para a estimativa da concentração do DNA genômico, seguiu-se o protocolo executado por Naegle et al., (2006), que consistiu na diluição da amostra em 1:100 em água Milli-Q autoclavada e foram feitas leituras em espectrofotômetro das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm para detecção do DNA, 280nm para proteínas e 330nm para fenol. A estimativa de pureza da preparação foi dada pela relação da absorbância do DNA/proteína, que deve estar entre 1,8-2,0 (SAMBROOK et al., 1989).

6.3 - Amplificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™, com um volume final de 50µL com os seguintes componentes:

- ~100 ng de DNAg (molde);
- 100 µM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP);
- 10 picomols de cada iniciador (*primer*);
- 2 mM de cloreto de magnésio;
- 1U de enzima Platinum Taq DNA *Polymerase High Fidelity* (Invitrogen).
- tampão 10X.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo, formado por todos os compostos da reação, com exceção do DNA genômico, cujo volume foi substituído por água Milli-Q estéril.

As condições para a amplificação dos genes Citocromo B (mtDNA) e 16S (rDNA) (LYMAN et al., 1999), foram:

- 94° C por 5 minutos
 - 94°C por 45 segundos
 - 50°C por 45 segundos
 - 72°C por 1 minuto
 - 72°C por 7 minutos
- } 40 vezes

Para a amplificação do domínio D2 do gene 28s (rDNA) (PORTER & COLLINS, 1996) foram seguidas as seguintes condições:

- 94° C por 5 minutos
 - 94°C por 45 segundos
 - 55°C por 45 segundos
 - 72°C por 1 minuto
 - 72°C por 7 minutos
- } 40 vezes

A confirmação da reação de amplificação foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corada com brometo de etídio e observada em luz UV.

6.4 - Iniciadores (*Primers*)

Para as amplificações dos fragmentos mitocondriais correspondentes ao gene que codifica para o Citocromo B (*Cyt B*) e à grande subunidade ribossomal (*16S*) foram utilizados os iniciadores descritos por Lyman et al., (1999), sendo esperado a amplificação de fragmento de 450pb.

➤ Citocromo B:

Forward: 5' – GGA CAA ATA TCA TTT TGA GGA GCA ACA G – 3'

Reverse: 5' – ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G – 3'

➤ grande subunidade ribossomal (*16S*):

Forward: 5' – CRC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3'

Reverse: 5' – AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA – 3'

Foram utilizados os *primers* descritos por Porter & Collins (1996) para amplificar o gene da grande subunidade ribossomal D2 (*28S*), sendo esperada a amplificação de fragmento de 650pb:

Forward: 5' – GCG AGT CGT GTT GCT TGA TAG TGC AG – 3'

Reverse: 5' – TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G – 3'

6.5 - Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados foram purificados por meio do kit “Illustra GFX DNA and Band Purification Kit” (GE life sciences) de acordo com as instruções do fabricante, para em seguida serem submetidos à reação de seqüenciamento.

6.6 - Seqüenciamento

Os produtos de PCR obtidos foram seqüenciados a partir das duas extremidades para gerar seqüências consenso.

A reação de seqüenciamento foi realizada com o kit BigDye™ V1.0 (DNA Sequencing Kit, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems) com modificações no protocolo proposto pelo fabricante.

Para o seqüenciamento foram utilizados 0,5 µL de Big Dye 1.0; 3,5 µL de Save Money (200 mM Tris-HCl pH9,0 + 5 mM MgCl₂); 2,0 µL *primer* F/R 1.6 pmol/µL; 4 µL de produto purificado, totalizando 10 µL de reação.

As condições para a amplificação dos genes Citocromo B e 16S foram:

- 96° C por 2 minutos
 - 96°C por 30 segundos
 - 50°C por 30 segundos
 - 60°C por 4 minutos
- } 40 vezes

As condições para a amplificação do gene D2 foram:

- 96° C por 2 minutos
 - 96°C por 30 segundos
 - 55°C por 30 segundos
 - 60°C por 4 minutos
- } 40 vezes

O produto da PCR de seqüenciamento foi precipitado da seguinte forma: adicionou-se 80 µL de Isopropanol 75% sobre o produto da PCR e as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente (TA), fora do alcance da luz ambiente. Após o período de incubação foram centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos (TA), para ser lavado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco no *speedy vaccum* por 10 minutos. As amostras foram ressuspensas em 2 µL de *Loading buffer* (12,3 µL de pré-mix + 57,7 µL de formamida) momentos antes de serem processadas em seqüenciador automático ABI-377.

6.7 - Análise dos dados

As seqüências de DNA obtidas, bem como outras seqüências obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizadas para dar suporte à análise, foram analisadas com o auxílio do software “*BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.5*” (HALL, 1999). A qualidade das seqüências obtidas foi verificada por meio de eletroferograma. As seqüências geradas foram alinhadas por meio do programa Clustal W (HALL, 1999).

A escolha de *T. sherlocki* como grupo externo baseou-se na distância geográfica que o separa de *T. rubrovaria*, tendo em vista que o objetivo do estudo consiste na caracterização de populações de *T. rubrovaria* do estado do Rio Grande do Sul, RS.

7 – Resultados e Discussão

7.1 - Extração do DNA genômico

O DNA genômico (DNAg) foi extraído de 10 exemplares adultos de cada colônia de *T. rubrovaria*, mortos momentos antes da realização do procedimento, sendo duas colônias oriundas de Quaraí (RS) – colônias QI e QII e uma de Caçapava do Sul (RS) – colônia CS, utilizando o protocolo modificado proposto por Bargues & Mas-Coma (1997).

O produto final da extração foi ressuspenso em 100µL de tampão TE 1X e 5 µl de DNAg foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, onde foi possível avaliar a integridade e a qualidade do DNAg extraído (Figuras 3, 4 e 5).

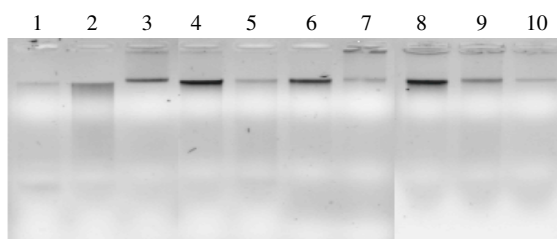


Figura 3: Eletroforese da extração do DNAg realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de 10 exemplares de *T. rubrovaria* oriundos da colônia de Quaraí (RS) – colônia QI.

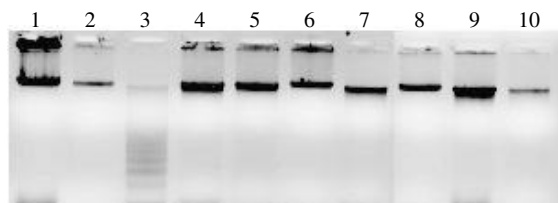


Figura 4: Eletroforese da extração do DNAg realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de 10 exemplares de *T. rubrovaria* oriundos da colônia de Quaraí (RS) – colônia QII.

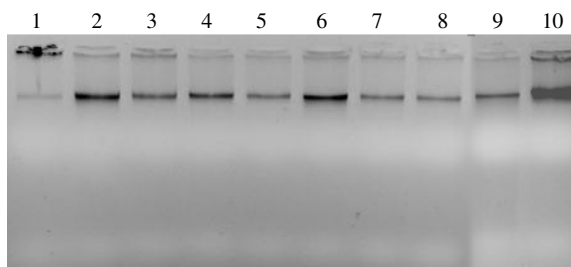


Figura 5: Eletroforese da extração do DNAg realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de 10 exemplares de *T. rubrovaria* oriundos da colônia de Caçapava do Sul (RS) – colônia CS.

Percebeu-se variações nas quantidades de DNAg obtidas para cada exemplar. Essa diferença não interferiu na realização das PCRs pois foram feitos ajustes nas concentrações de DNAg com a finalidade de obter amostras e reações mais uniformes possíveis.

7.2 – Genes Mitocondriais

7.2.1 - Grande subunidade ribossomal (16S)

A amplificação do gene mitocondrial 16S ocorreu sob temperatura de anelamento de 50°C, gerando um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) para todos os exemplares das três colônias em estudo. Realizou-se a PCR com Taq de alta fidelidade (*Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* - Invitrogen), sempre acompanhada de um controle negativo, com o intuito de verificar se não ocorreram amplificações de materiais inespecíficos/contaminantes.

Os produtos obtidos foram purificados com o kit comercial (Illustra GFX DNA and Band Purification Kit – GE life sciences). Os produtos purificados são mostrados nas Figuras 6, 7 e 8.

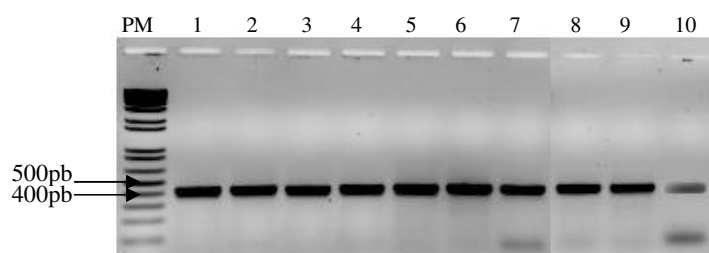


Figura 6. Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (16S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QI (Quaraí- RS).

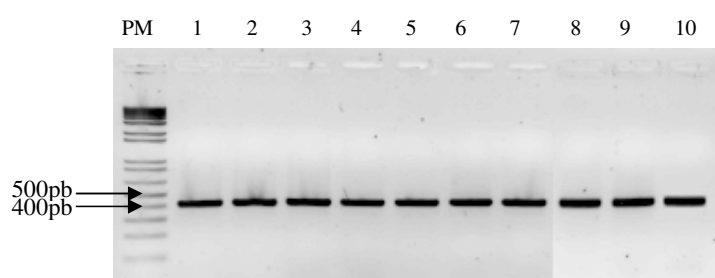


Figura 7. Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (16S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QII (Quaraí- RS).

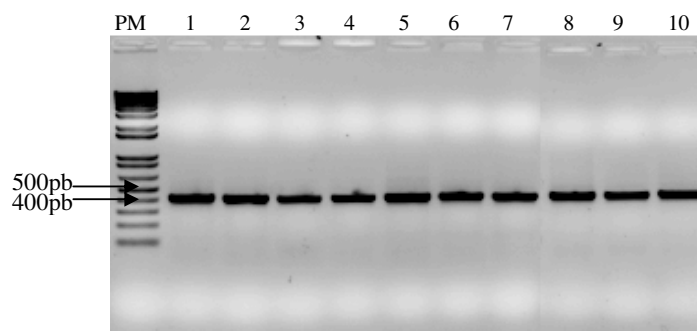


Figura 8. Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (16S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia CS (Caçapava do Sul- RS).

Os produtos purificados foram seqüenciados diretamente, gerando seqüências de 330 pares de bases para a colônia QI e QII e de 309 para a colônia CS (Figuras 9, 10 e 11), sendo possível verificar a existência de regiões polimórficas.

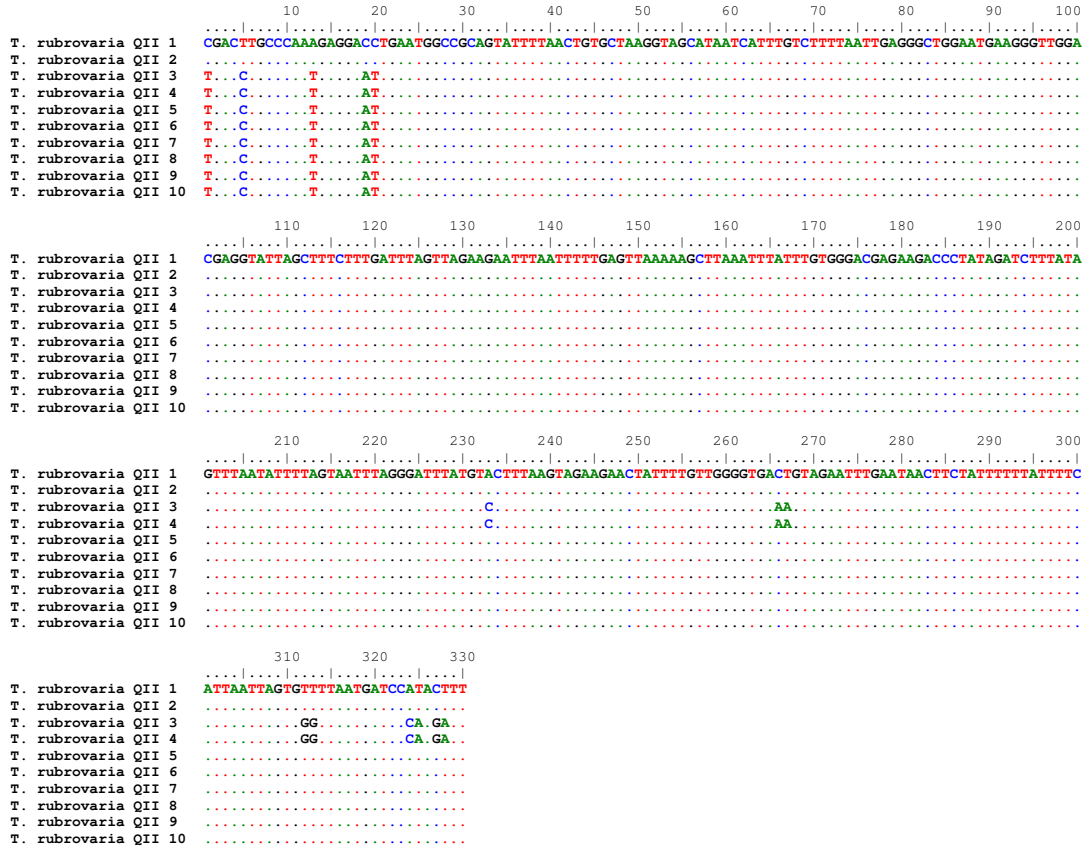


Figura 9: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do DNA mitocondrial de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QII.

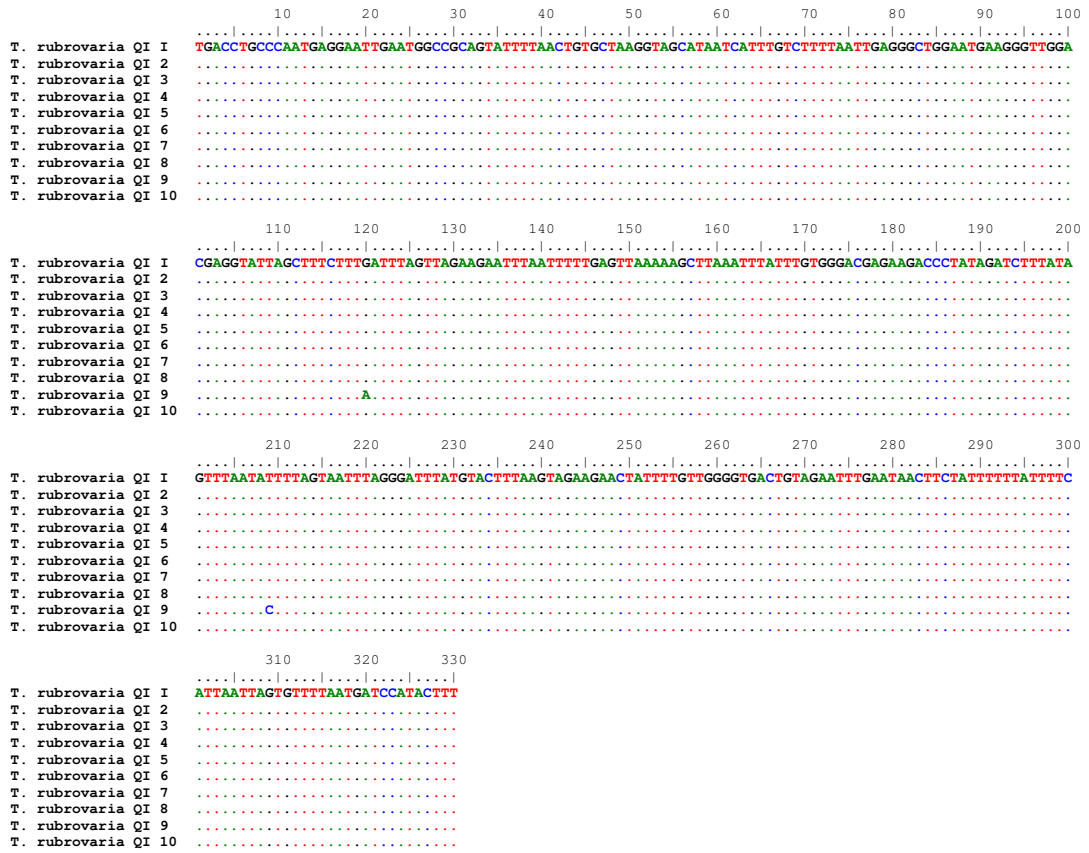


Figura 10: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do DNA mitocondrial de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QI.

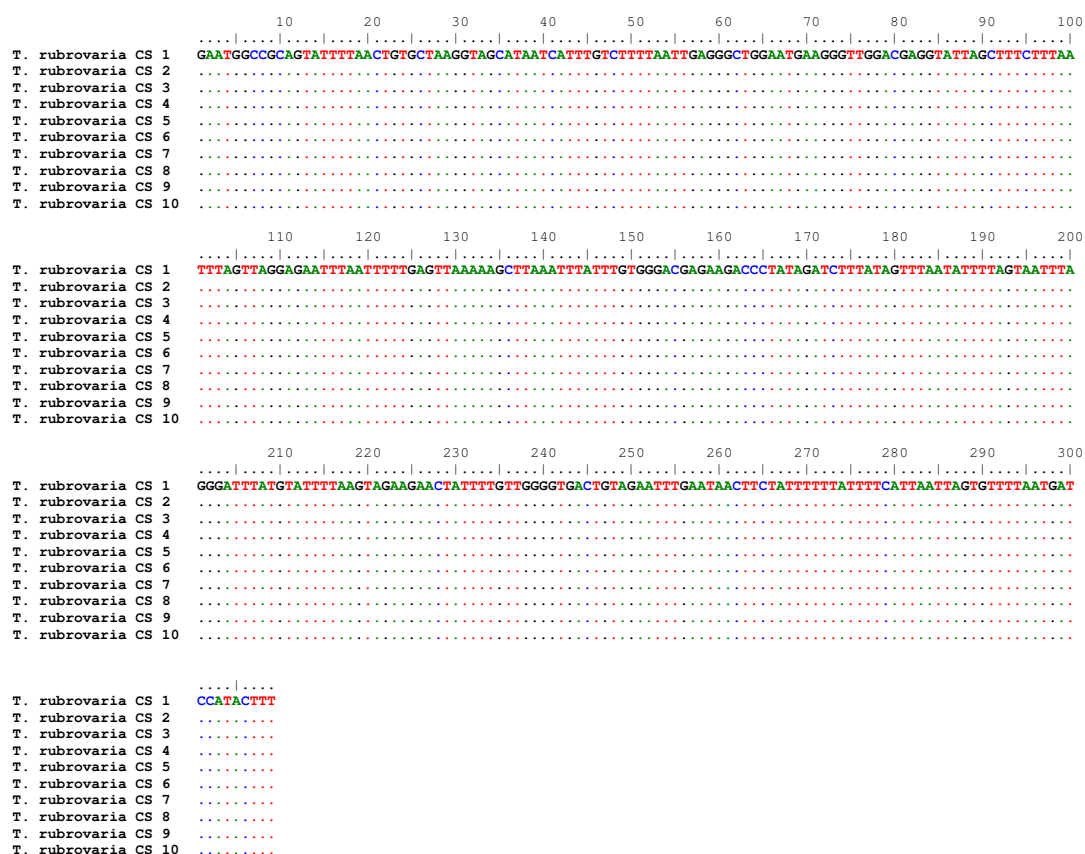


Figura 11: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do DNA mitocondrial de exemplares de *T. rubrovaria* colônia CS.

Para avaliar a variabilidade interpopulacional as seqüências foram comparadas com as de *T. rubrovaria* CTA117A (código de acesso EU827228), *T. rubrovaria* CTA117C (código de acesso EU827229), *T. rubrovaria* CTA108A (código de acesso EU827227) *Triatoma circummaculata* ES (AF021189), *Triatoma platensis* (EU827232) e *Triatoma sherlocki* (EU489057) (Mendonça et al., 2008) disponíveis no banco de dados do “National Center of Biotechnology Information” – NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os alinhamentos foram realizados no programa BioEdit, através do Clustal W (Figura 11), que gerou um produto de 267 pares de bases.

	210	220	230	240	250	260	
T. rubrovaria QII 1	GGGATTATG	TACTTTAAG	TAGAAGAACT	TATTTGTTGGGGT	GACTGTAGAATT	TGAATAACTTCTA	
T. rubrovaria QII 2		C.....			AA.....		
T. rubrovaria QII 3		C.....			AA.....		
T. rubrovaria QII 4							
T. rubrovaria QII 5							
T. rubrovaria QII 5							
T. rubrovaria QII 6							
T. rubrovaria QII 7							
T. rubrovaria QII 8							
T. rubrovaria QII 9							
T. rubrovaria QII 10							
T. rubrovaria QI 1							
T. rubrovaria QI 2							
T. rubrovaria QI 3							
T. rubrovaria QI 4							
T. rubrovaria QI 5							
T. rubrovaria QI 6							
T. rubrovaria QI 7							
T. rubrovaria QI 8							
T. rubrovaria QI 9							
T. rubrovaria QI 10							
T. rubrovaria CS 1		T.....					
T. rubrovaria CS 2		T.....					
T. rubrovaria CS 3		T.....					
T. rubrovaria CS 4		T.....					
T. rubrovaria CS 5		T.....					
T. rubrovaria CS 6		T.....					
T. rubrovaria CS 7		T.....					
T. rubrovaria CS 8		T.....					
T. rubrovaria CS 9		T.....					
T. rubrovaria CS 10		T.....					
T. rubrovaria CTA117A		T.....					
T. rubrovaria CTA117C		T.....					
T. rubrovaria CTA108A		T.....					
T. circummaculata							
T. sherlocki		A.....	TT.....			A.....	
T. platensis	T.....	TGT.....	T.....			A.....	

Continuação figura 12

No alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) das colônias de *T. rubrovaria* CS, QI e QII observou-se polimorfismo intra e interpopulacional, sendo que a QII mostrou-se mais polimórfica do que a colônia QI. Ao passo que a CS, procedente de Caçapava do Sul não mostrou variações intrapopulacionais.

Ao alinhar as três populações das colônias de *T. rubrovaria* em estudo juntamente com outras seqüências de *T. rubrovaria*, *T. circummaculata* e *T. sherlocki* foi possível observar regiões com maior polimorfismo (185 - 256 pares de bases) e outras com menor polimorfismo (20 – 150 pares de base). De um modo geral as seqüências apresentaram-se conservadas por quase toda sua extensão.

7.2.2 - Citocromo B (Cyt B)

A amplificação do gene mitocondrial Citocromo B ocorreu sob temperatura de anelamento de 50°C, utilizando-se enzima de alta fidelidade (*Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* - Invitrogen), gerando um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases para todos os exemplares das três colônias em estudo. As reações foram acompanhadas de um controle negativo, com o intuito de verificar se não ocorreriam amplificações de materiais inespecíficos/contaminantes.

Os produtos obtidos foram purificados com kit comercial (Illustra GFX DNA and Band Purification Kit – GE life sciences). Os produtos purificados são mostrados nas Figuras 13, 14 e 15.

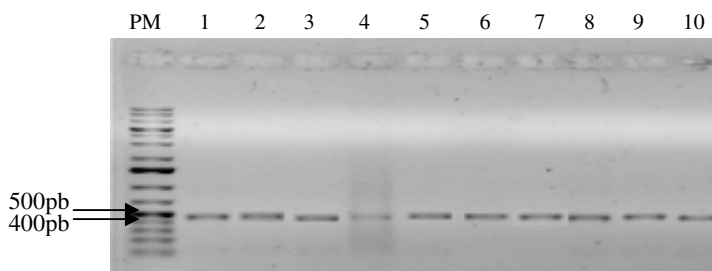


Figura 13. Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do Citocromo B realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QI (Quaraí- RS).

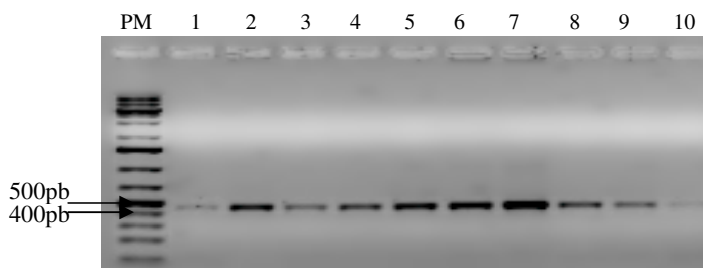


Figura 14. Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do Citocromo B realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QII (Quaraí- RS).

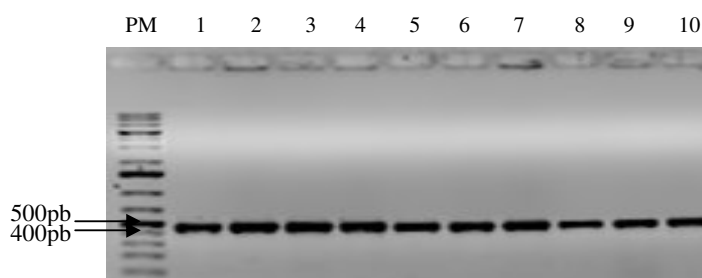


Figura 15. Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do Citocromo B realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia CS (Caçapava do Sul - RS).

Os produtos purificados foram seqüenciados diretamente, sem clonagem e geraram seqüências de 364 pb para a colônia QI, 367 para a QII e de 405 para a colônia CS (Figuras 16, 17 e 18), sendo possível observar a existência de polimorfismos.

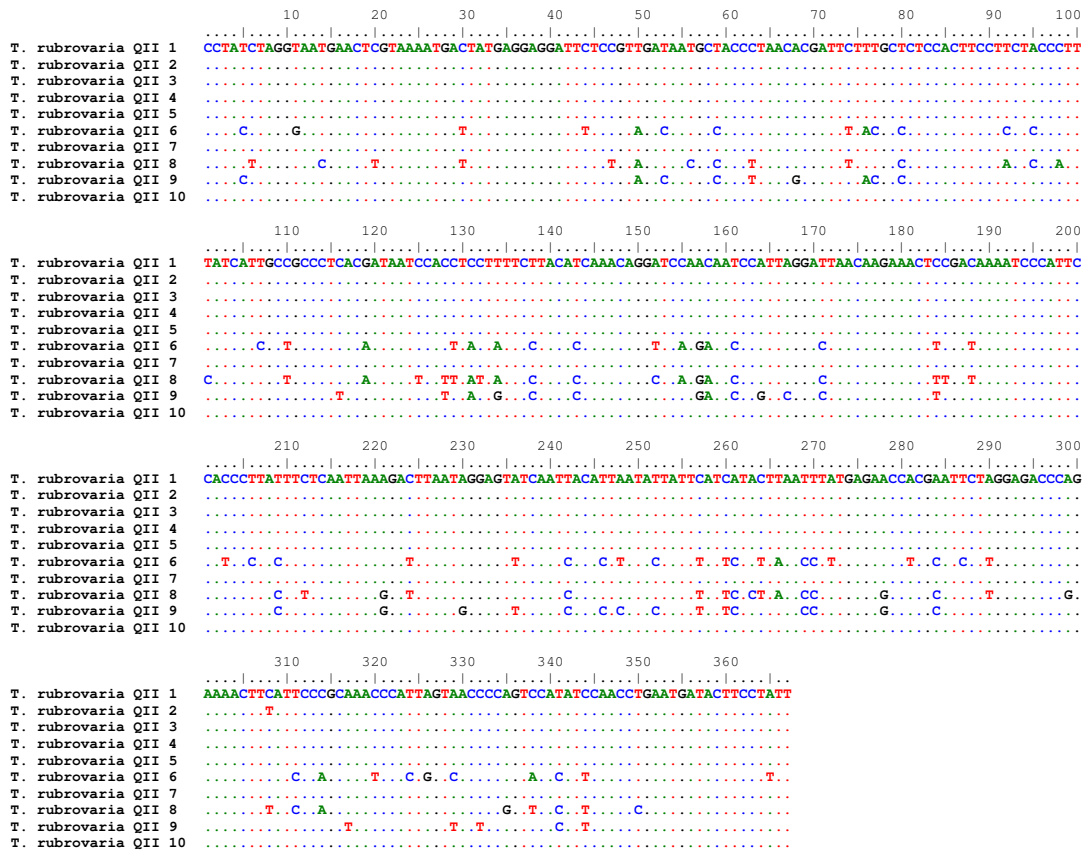


Figura 16: Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QII.

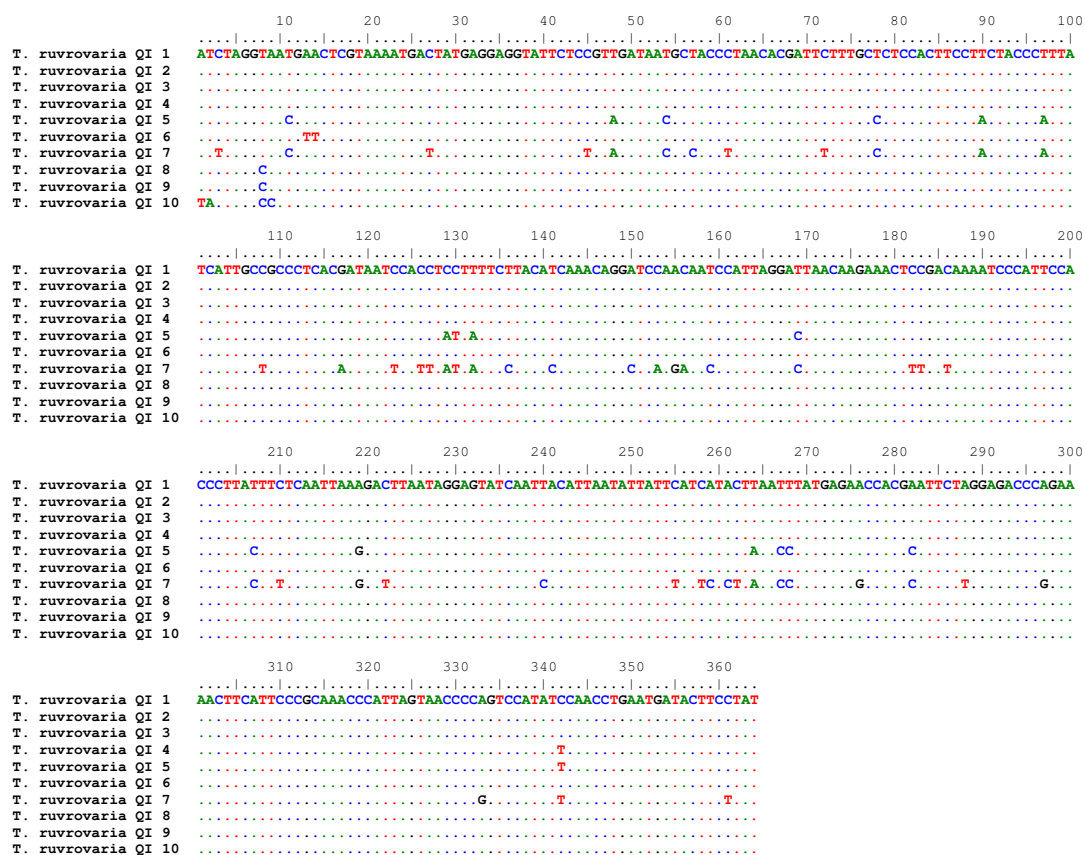


Figura 17: Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QI.

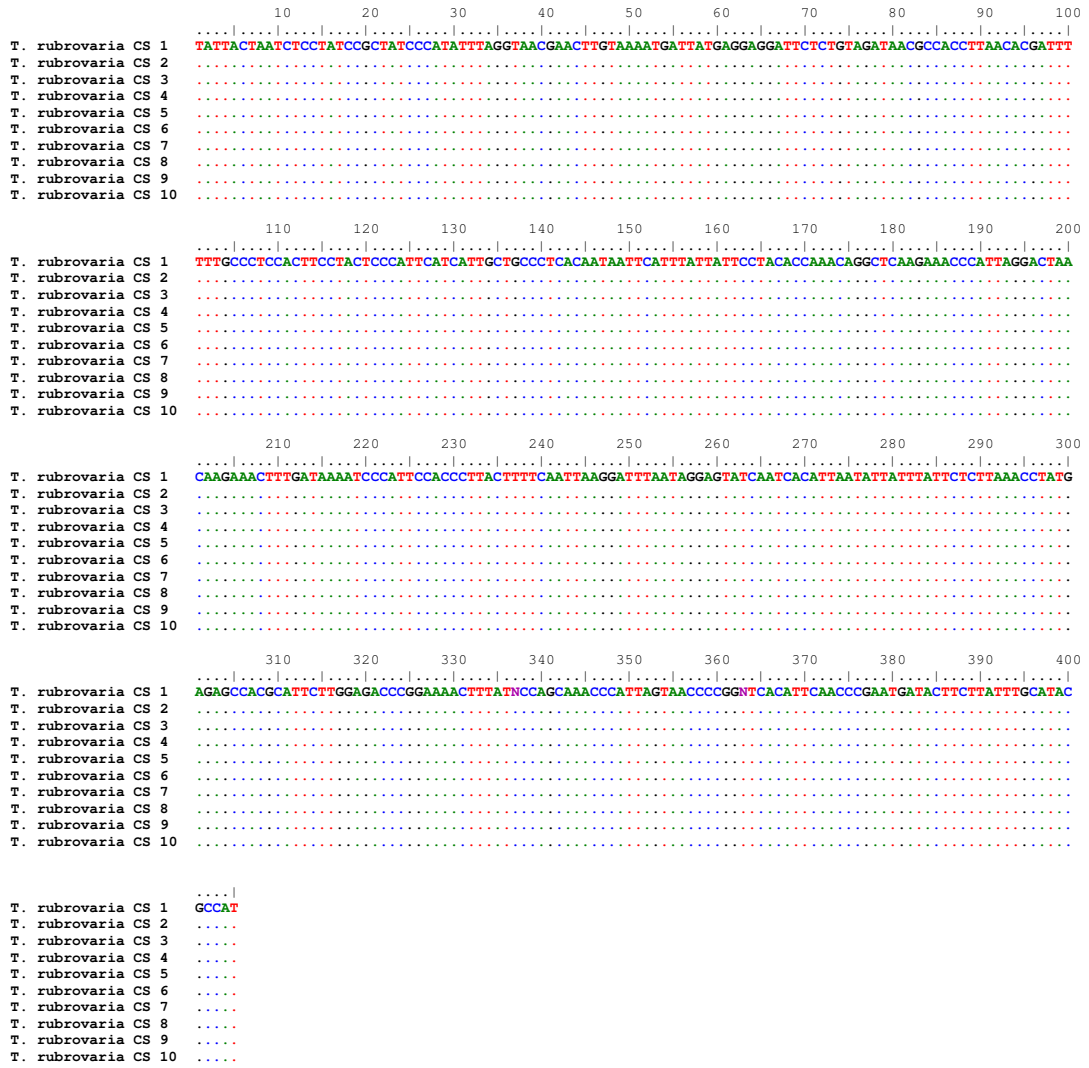


Figura 18: Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de exemplares de *T. rubrovaria* colônia CS.

A análise da variabilidade por meio do seqüenciamento do gene do Citocromo B revelou maior variabilidade intrapopulacional para as populações QI e QII que aquelas verificadas por meio do seqüenciamento da grande subunidade ribossomal (16S), podendo-se então sugerir citocromo B como um marcador mais adequado para avaliar variabilidade de populações.

As seqüências foram comparadas com a de *Triatoma sherlocki* (MENDONÇA et al., 2008) (EU489058) disponível no banco de dados do “National Center of Biotechnology Information” – NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os alinhamentos foram realizados no programa BioEdit, por meio do Clustal W (Figura 19), que gerou um produto de 360 pares de bases.

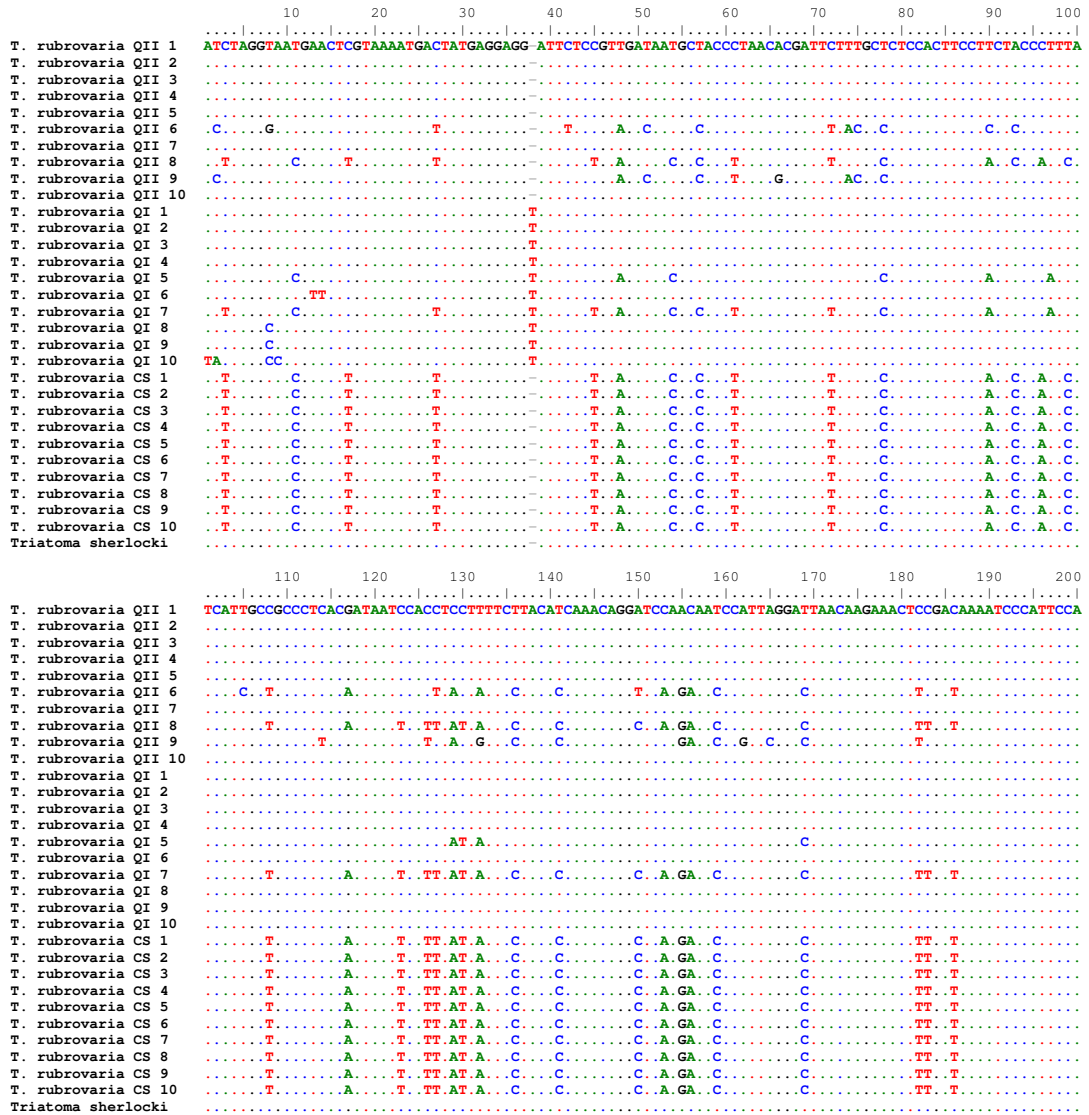


Figura 19: Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do Citocromo B de *T. rubrovaria* (colônias QI, QII e CS) e *T. sherlocki*. (Grupo externo)

Quadro 3: Alinhamento das seqüências de 120 aminoácidos do gene mitocondrial do Citocromo B observados em *T. rubrovaria* e *T. sherlocki*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
<i>T. rubrovaria</i> QII C1		I*VMS*NDY	EE?FSVDNAT	LTRFFALHFL	LPFTIAALTM	IHLFLHQTG	SNNPLGLTSN	SDKIPFFHYF	SIKDLMGVSI	TLMLFIMNL	WEPRILGDPE	NFIPANPLVT	PVHIQPEWIF
<i>T. rubrovaria</i> QII C2	T*G...*	...?	...Y	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QII C3	*....*	...?	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C1	*....*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C2	*.T.*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C3	*.F.*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C4	*.T.*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C5	*A...*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C6	*A...*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> QI C7	*A...*	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. rubrovaria</i> CS	*.T.L*	...?	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L
<i>T. sherlocki</i>	*....*	...?	...V	...I	...S	...F	...L	...L	...L	...L	...L	...L	...L

C1 = consenso 1; C2= consenso 2; C3= consenso 3; C4= consenso 4; C5= consenso 5; C6= consenso 6; C7= consenso 7; ; QI = Quarai I; QII = Quarai II;
CS = Caçapava do Sul;

Após o alinhamento das seqüências de *T. rubrovaria* com *T. sherlocki* (grupo externo - GenBank), a seqüência consenso apresentou 360 pb com 108 substituições, das quais 199 são transições, 90 transversões e 95 sítios polimórficos, representando 26,4% da população.

A partir das seqüências de nucleotídeos do Cyt B, realizou-se também a tradução das mesmas, gerando uma seqüência de 120 aminoácidos, que também foram alinhadas (Tabela 3).

Nesse alinhamento foi possível verificar que as bases polimórficas das seqüências dos nucleotídeos correspondem às mudanças encontradas nas seqüências de aminoácidos.

Na população QI verificou-se a existência de sete perfis de seqüências consenso ao passo que para a QII, três perfis. Também foi possível identificar a existência de variabilidade intra e inter populações. A população CS apresentou apenas uma seqüência consenso, revelando ser uma população homogênea, que apresenta apenas variabilidade interpopulacional.

7.3 – Genes Nucleares

7.3.1 – Grande subunidade ribossomal D2 (28S)

A amplificação da grande subunidade ribossomal (28S) do DNA nuclear da região variável D2, ocorreu a uma temperatura de anelamento de 55°C gerando um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases para todos os exemplares das três colônias em estudo. As reações foram acompanhadas de um controle negativo, com o intuito de verificar se não ocorreram amplificações de materiais inespecíficos/contaminantes.

Os produtos obtidos foram purificados com kit comercial (Illustra GFX DNA and Band Purification Kit – GE life sciences). Os produtos purificados são mostrados nas Figuras 20, 21 e 22).

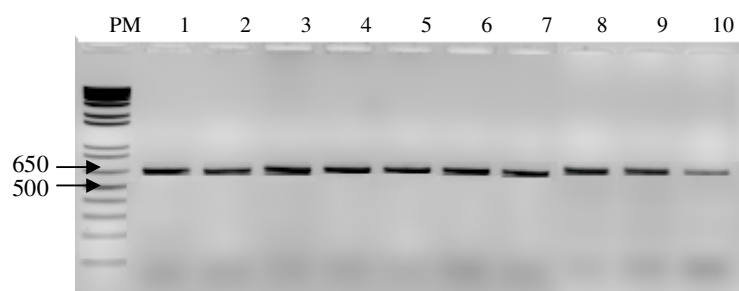


Figura 20. Eletroforese da amplificação do gene nuclear da grande subunidade ribossomal D2 (28S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QI (Quaraí- RS).

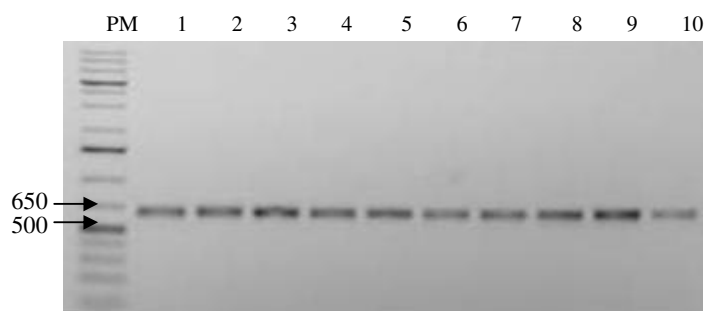


Figura 21. Eletroforese da amplificação do gene nuclear da grande subunidade ribossomal D2 (28S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia QII (Quaraí- RS).

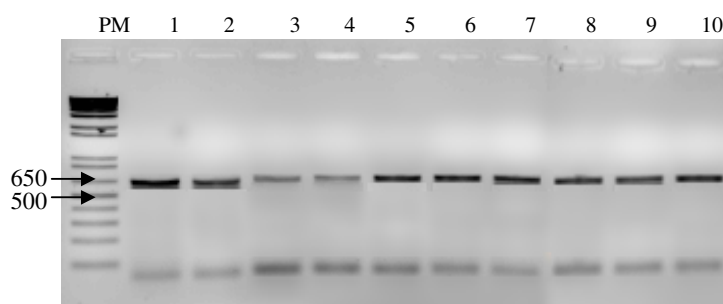


Figura 22. Eletroforese da amplificação do gene nuclear da grande subunidade ribossomal D2 (28S) realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 10 – exemplares de *T. rubrovaria* da colônia CS (Caçapava do Sul - RS).

Os produtos purificados foram seqüenciados diretamente, sem clonagem e geraram seqüências de 433 pb para a colônia QI, 405 para a QII e de 453 para a colônia CS (Figuras 23, 24 e 25). O alinhamento de todas as seqüências de *T. rubrovaria* está disponível na figura 26.

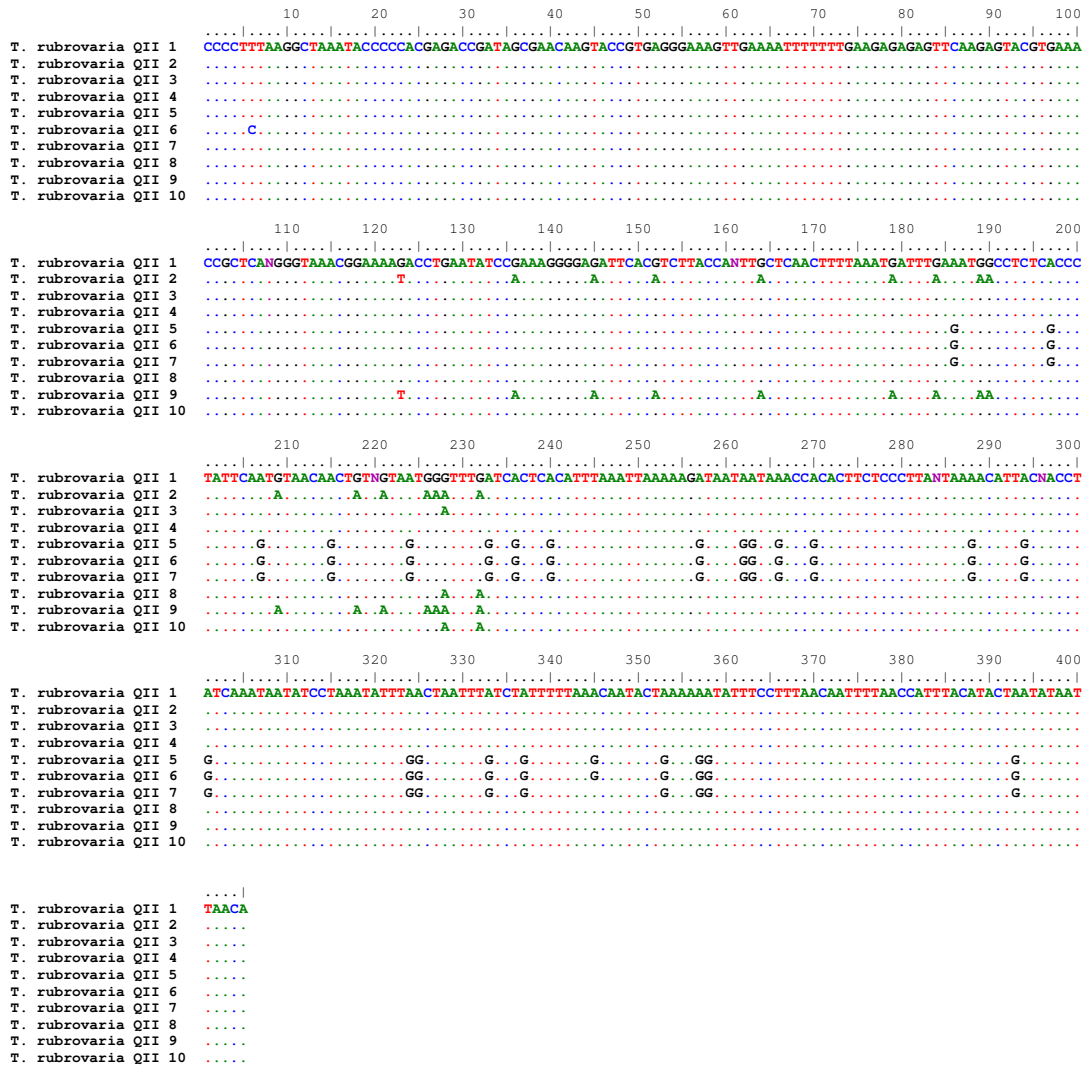


Figura 23: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S), observados de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QII.

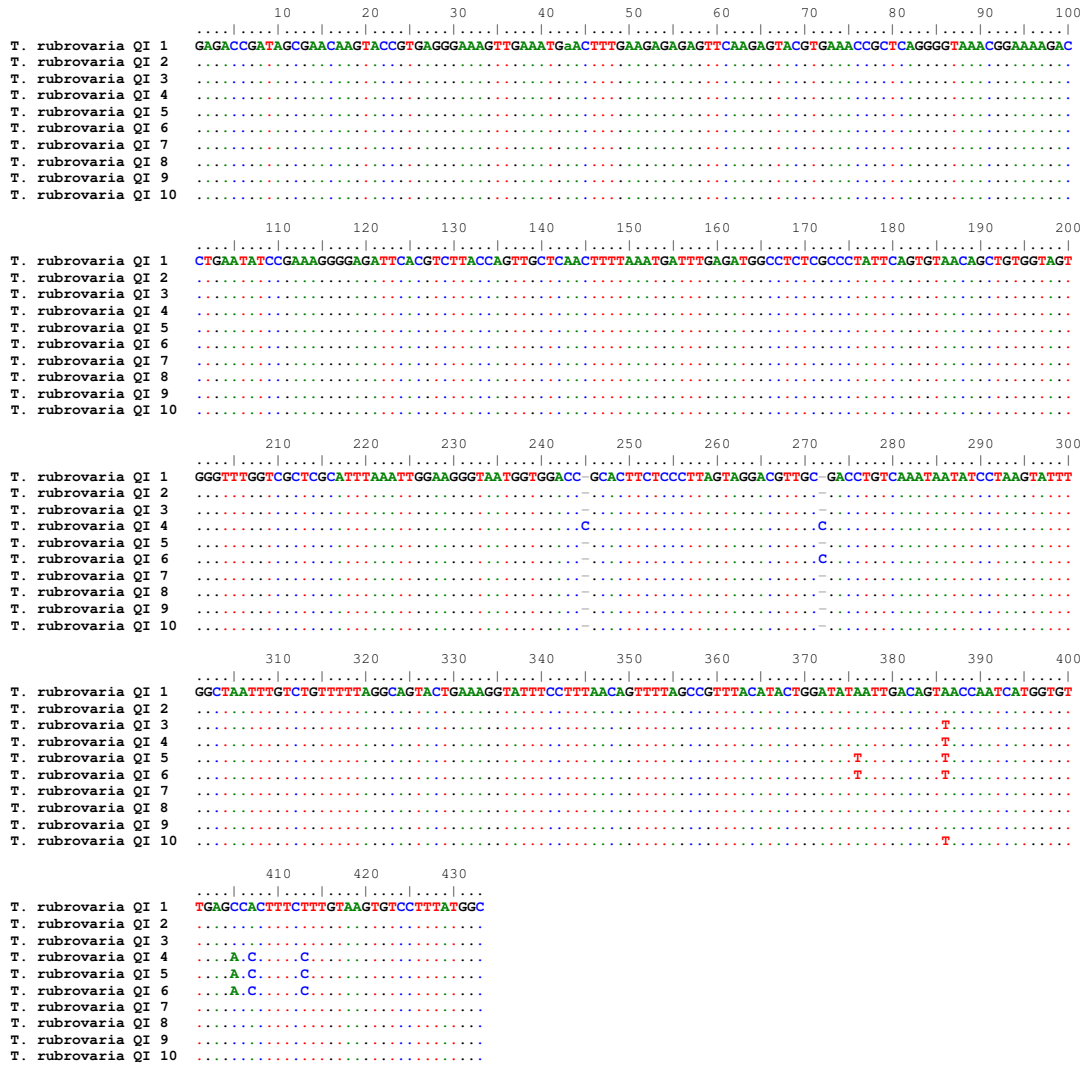


Figura 24: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S), observados de exemplares de *T. rubrovaria* colônia QI.

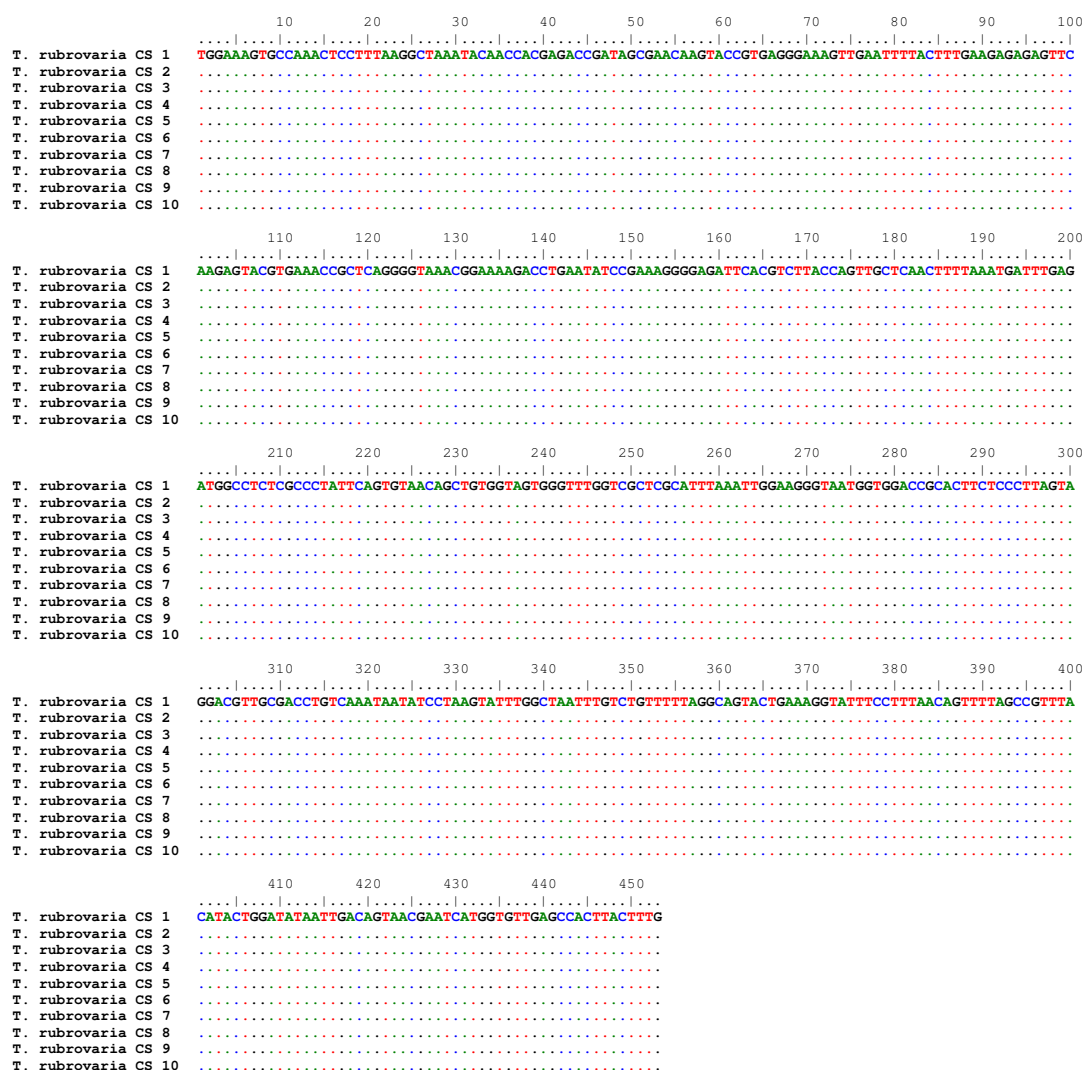


Figura 25: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S), observados de exemplares de *T. rubrovaria* colônia CS.

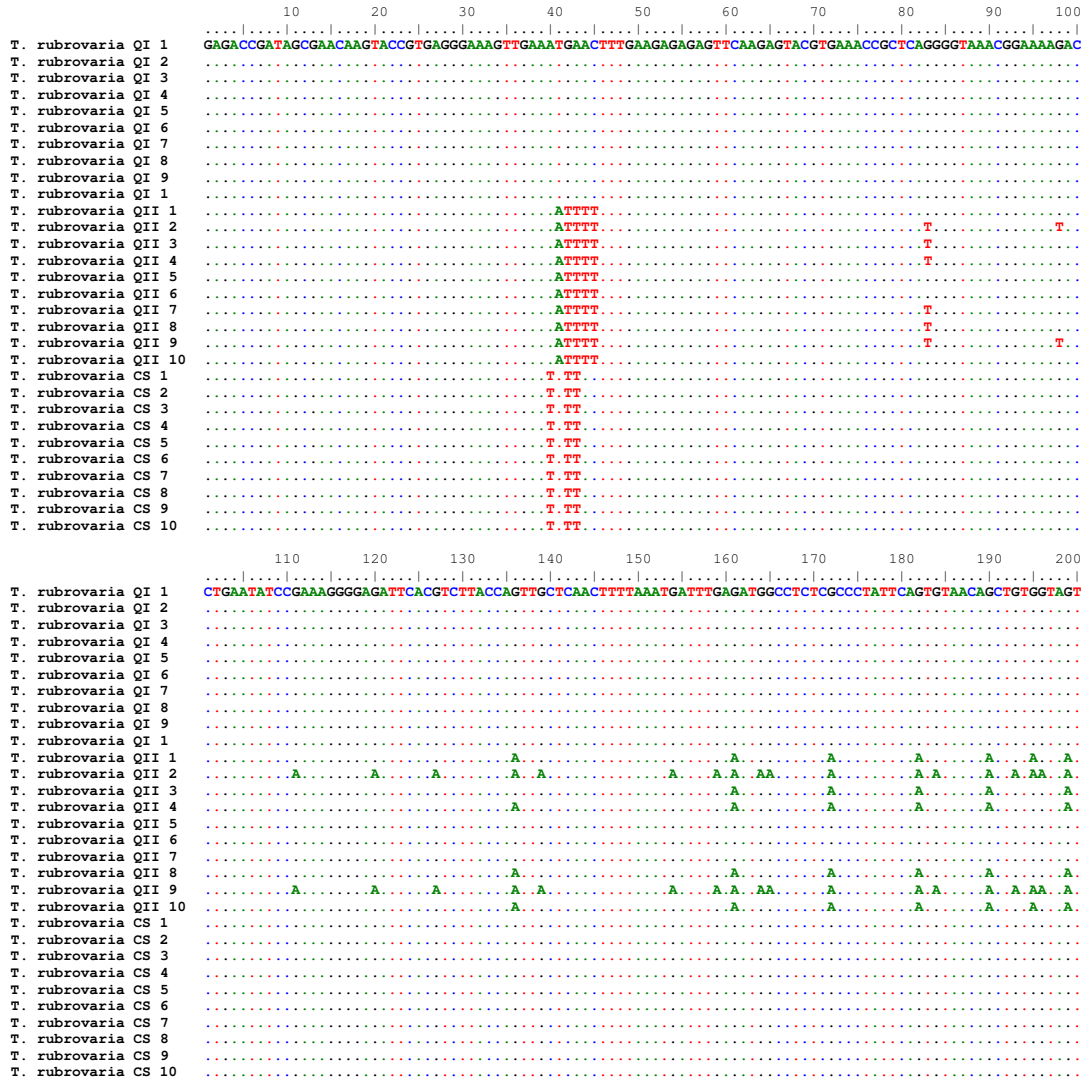


Figura 26: Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S) de *T. rubrovaria* (colônias QI, QII e CS).

Continuação da figura 26

Lent (1942) em estudo sobre triatomíneos do Rio Grande do Sul relatou a existência de 13 morfotipos de pronoto para *T. rubrovaria*, baseado na distribuição da coloração vermelha. Abalos & Wygodzinsky (1951), em estudos sobre triatomíneos encontrados no Uruguai e Argentina descreveram a existência de cinco padrões cromáticos, sendo dois para exemplares argentinos e três para exemplares uruguaios.

Em 1979 Lent & Wygodzinsky relataram a existência de oito padrões cromáticos e afirmaram que essas variações são individuais e não estão relacionadas a uma determinada região geográfica (Figura 27). Almeida et al. (2002) observou que *T. rubrovaria* coletados em diferentes regiões do RS apresentam quatro padrões cromáticos distintos.

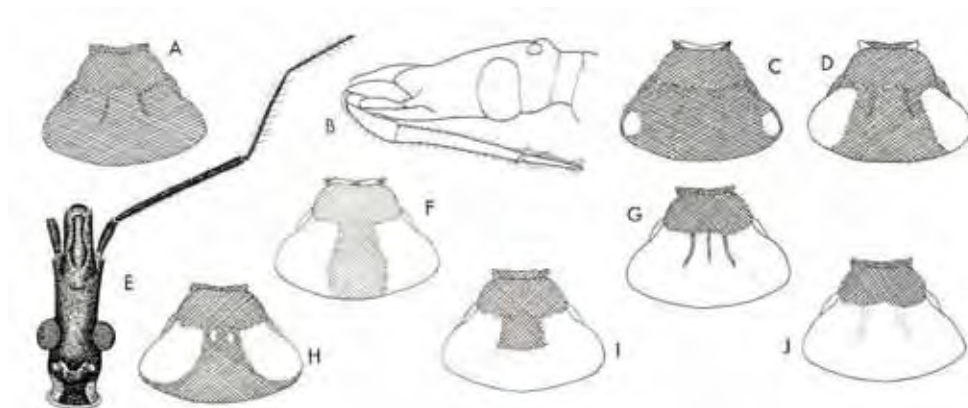


Figura 27: Padrões cromáticos de pronoto de *T. rubrovaria*. A = pronoto preto uniforme; B = vista lateral da cabeça; C e D = padrões cromáticos de pronotos; E = vista dorsal da cabeça; F – J = padrões cromáticos de pronotos. Lent & Wygodzinsky, 1979.

As populações de *T. rubrovaria* estudadas foram coletadas em Caçapava do Sul - CS (ROSA et al., 1995) e Quaraí – QI e QII. (MARTINS et al., 2006). Nos exemplares dessas três populações foram observados três padrões cromáticos de pronoto, que se mantêm presente por várias gerações nas populações mantidas em laboratório, sendo um padrão restrito à população de Caçapava do Sul e os dois restantes nas populações oriundas de Quaraí.

A característica das três populações está de acordo com Abalos y Wygodzinsky, 1951, pois existem diferentes morfotipos por região mas discorda em partes daquelas feitas por Lent & Wygodzinsky, 1979, pois existem dois morfotipos numa mesma região, Quaraí.

O fenótipo da população CS é distinto das populações QI e QII. Entretanto, as populações QI e QII foram coletadas no mesmo local, no município de Quaraí. Baseado nas diferenças morfológicas entre essas três populações, estudos morfométricos realizados por meio da mensuração do comprimento da cabeça, tórax e abdomen, das distâncias inter, ante e pós-oculares, diâmetro dos olhos e o comprimento dos três segmentos da probóscida (DUJARDIN et al., 1999) e pela análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn, revelaram diferenças significativas entre essas três populações (Tabela 1).

Tabela 1: Médias e desvios-padrão das mensurações (mm) do comprimento de cabeça, tórax, abdome, distância interocular (DIO), distância anteocular (DAO), distância pós-ocular (DPO), diâmetro dos olhos (DO), 1º., 2º. e 3º. segmentos da probóscida (Prob1, Prob 2 e Prob 3) de adultos machos de três populações de *T. rubrovaria*. $P < 0,0001$ = extremamente significativo; $P < 0,05$ = significativo; $P > 0,05$ = Não significativo

	QII	QI	CS	Significância
Cabeça	$3,69 \pm 0,06$	$3,48 \pm 0,14$	$3,47 \pm 0,99$	$P = 0,0010$
Tórax	$4,75 \pm 0,20$	$4,12 \pm 0,22$	$4,64 \pm 0,33$	$P < 0,0001$
Abdome	$11,59 \pm 0,54$	$11,07 \pm 0,43$	$11,30 \pm 0,77$	$P = 0,0419$
DIO	$0,80 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,05$	$P = 0,0052$
DAO	$2,19 \pm 0,06$	$2,09 \pm 0,06$	$2,33 \pm 0,16$	$P < 0,0001$
DPO	$0,74 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,07$	$0,69 \pm 0,08$	$P = 0,0098$
DO	$1,18 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,04$	$1,04 \pm 0,05$	$P = 0,0001$
Prob1	$0,92 \pm 0,07$	$0,96 \pm 0,09$	$0,89 \pm 0,05$	$P = 0,752$
Prob2	$2,28 \pm 0,08$	$2,11 \pm 0,15$	$2,27 \pm 0,12$	$P = 0,004$
Prob3	$1,28 \pm 0,25$	$1,16 \pm 0,07$	$1,18 \pm 0,06$	$P = 0,0378$

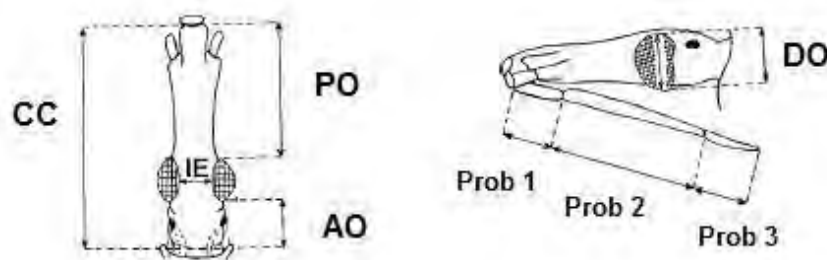


Figura 28: Padrões de mensuração de segmentos da cabeça. CC = comprimento da cabeça; PO = distância pós-ocular; AO = distância anteocular; DO = diâmetro dos olhos; Prob 1, Prob 2 e Prob 3 = 1º, 2º. e 3º. segmentos da probóscida. DUJARDIN et al., 1999, modificado.

Tais evidências levaram ao estudo sobre a variabilidade genética dessas populações.

Pacheco et al., (2007) estudou a variabilidade genética de populações de *T. rubrovaria* de diferentes localidades do RS, utilizando RAPD e a análise de sequências de rDNA e também detectou heterogeneidade intra e interpopulacionais.

Giordano et al. (2005) utilizou o sequenciamento do Cyt B e Garcia et al. (2003) analisou sequências de 12S (mtDNA) e (16S rDNA) para avaliar a variabilidade genética de populações distintas de *T. infestans*, exaltando a possibilidade da avaliação de polimorfismos de DNA de forma direta.

Ao alinhar as seqüências do 16S das populações QI, QII e CS observou-se a existência de polimorfismos intra e inter populacionais. Nas colônias QI e QII foi verificado a existência de duas seqüências consenso para cada população, com polimorfismos intra e interpopulacionais enquanto que para a população CS, apenas uma seqüência consenso foi verificada, revelando ser uma população homogênea, apresentando apenas variabilidade interpopulacional.

As seqüências do Cyt B mostraram grande polimorfismo intra e interpopulacional para as colônias QI e QII do que aquele apresentado na análise do 16S – QI apresentou sete enquanto QII apresentou quarto. A população CS mostrou-se uniforme, mostrando apenas uma seqüência consenso.

A análise das seqüências do 28S das populações QI, QII e CS observou-se a existência de polimorfismos intra e inter populacionais. Na colônias QI observou-se três e na QII seqüências consenso com baixo polimorfismos intra e interpopulacionais enquanto que para a população CS, apenas uma seqüência consenso foi verificada, revelando ser uma população homogênea, apresentando apenas variabilidade interpopulacional.

A homogeneidade da população CS evidenciada pela análise de três marcadores (Cyt B, 16S e 28S) pode ser justificada pelo longo tempo de existência da colônia, por isso não é recomendável a utilização de populações antigas para estudos de variabilidade.

De acordo com os resultados, é possível sugerir que Cyt B é um marcador mais indicado para a análise da variabilidade populacional que o 16S e o 28S.

Este trabalho, bem como os prévios estudos morfométricos e morfológicos, mostraram-se complementares, isto é, não ocorreram discordâncias entre os resultados de cada uma das três avaliações (morfológicas, morfométricas e seqüenciamento). Também ficou evidente que as análises de seqüências são úteis para o estudo de variabilidade entre populações de *T. rubrovaria*. Entretanto, estes resultados não dispensam outros estudos que venham contribuir para uma melhor caracterização de populações de *T. rubrovaria*.

8. Conclusões

- As três populações de *T. rubrovaria* (CS, QI e QII) estudadas apresentaram polimorfismo identificável por meio de análises de seqüências do DNA mitocondrial e nuclear;
- O gene Cyt B mostrou-se altamente polimórfico, sendo útil para caracterizar e avaliar diferenças entre populações de *T. rubrovaria*;
- O gene 16S apresentou menor polimorfismo, mesmo assim é válido seu uso em estudos de variabilidade e caracterização de populações;
- O gene D2 é altamente conservado, não sendo útil para avaliar variabilidade populacional.

9. Referências Bibliográficas

ABAD-FRANCH, F. & MONTEIRO, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. An. Acad. Bras. Cienc., v. 77, n. 3, p. 437-54, 2005.

ABALOS, J. W. & WYGODZINSKY, P. Las Triatominae argentinas (Reduviidae, Hemiptera). Instituto Med. Regional Tucumán. (monografía n 2), Argentina, v. 601 179pp, 1951.

ALMEIDA, C.E.; PACHECO, R.S.; NOIREAU, F. COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., v. 97, n. 6, p. 829-34, 2002.

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. v.18, p. 489-522, 1987.

BARGUES, M. D. & MAS-COMA, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18S rDNA Sequences. Mol. Biol. Evol. v.14, n.5, p. 569-577, 1997.

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

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., v. 96, n. 1, p. 159-164, 2002.

BESANSKY, N. J.; LEHMANN, T.; FAHEY, G. T.; FONTENILLE, D.; BRAACK, L. E. O.; HAWLEY, W. A.; COLLINS, F. H. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. Genetics v.147, p. 1817-28, 1997.

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

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in Genetics v. 19, n. 7, p. 370-75, 2003.

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

COSTA, J. & FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz v.102, n. 87-90, 2007.

DIAS, J.C.P. & BORGES DIAS, R. Housing and the control of vectors of human Chagas' disease in the State of Minas Gerais, Brazil. Bull. PAHO v.16, p. 117-29, 1982.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanossoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p., 2000.

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., v. 35, n.6, p. 669-678, 2002.

DUJARDIN, J.P.; STEINDEL, M.; CHAVEZ, T.; MACHANE, M.; SCHOFIELD, C.J. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 94, n. 4, p. 565-569, 1999.

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 v.670, p. 1-12, 2004.

FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva, Trad. de Mário Vivo e coord. de Fabio de Melo Sene. 2ª Ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p., 1992.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannet, 1919 (Hemíptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa. v. 202, p. 1-36, 2003.

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

GARCIA, B. A. & POWELL, J. R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J. Med. Entomol.* v. 35, p. 232-238, 1998.

GARCIA, B. A.; MORIYAMA, E.N., POWELL, J.R. Mitochondrial DNA Sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic Relationships. *J. Med. Entomol.* v. 38, n. 5, p. 675-83, 2001.

GARCIA, B. A., MANFREDI, C., FICHERA, L. & SEGURA, E. L. Short Report: Variation in Mitochondrial 12s and 16s Ribosomal DNA Sequences in Natural Populations of *Triatoma Infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 68, n. 6, p. 692–694. 2003.

GASSER, R. B., AND H. HOSTE. Genetic markers for closely related parasitic nematodes. *Molecular and Cellular Probes* v. 9, p. 315-320, 1996.

GASPARICH, G. E.; SHEPPARD, W. S.; HAN, H. Y.; McPERON, B. A.; STECK, G. J. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. *Insect Mol. Biol.* v.4, p. 61-67, 1995.

GIORDANO, R., CORTEZ, J. C. P., PAULK, S. & STEVENS, L. Genetic Diversity of *Triatoma Infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia Based on the Mitochondrial Cytochrome B Gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 753-760, 2005.

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

- HYPISA, V.; TIETZ, D.F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R.O.M.; GALVÃO, C. & JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol. Phylog. Evol.* v.23, p. 447-57, 2002.
- 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.* v. 91, p. 165-168, 2000.
- LENT, H. & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bull. Am. Mus. Nat. His.* v.163, p. 123-520, 1979.
- LENT, H. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. *Rev Flum Med* v. 6, p. 1-13, 1942.
- LENT, H.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Rhodnius stali* n. Sp. Afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 88, p. 605-14, 1993.
- LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 94, n. 1, p. 89-92. 1999.
- LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). *Jornal da Unicamp*, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 11 a 17 de abril de 2005. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju283pag02.pdf. Acesso em: 04/09/2007.

LYMAN, D. F., MONTEIRO, F.A., ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P.; & BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. Am. J. Trop. Med. & Hyg. v. 60, p. 377-386, 1999.

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., MAS-COMA, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. Infection, Genetics and Evolution v.1, p. 225-235, 2002.

MARTINS, P. A. M., CASTANHO, R. E. P., CASANOVA, C., CARAVELAS, D. T., FRIAS, G. T., RUAS-NETO, A. L. & ROSA, J. A. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v. 39, n. 2, p. 198-202, 2006.

MENDONÇA, V. J., SILMA, M. T. A., ARAUJO, M R. F., MARTINS JR, J., BACCI JR, M., ALMEIDA, C. E. COSTA, J., GRAMINHA, M. A. S., CICARELLI, R. M. B. and ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location into *T. brasiliensis* complex. Am J. Trop. Med. Hyg. Submetido em 2008.

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

MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A.; BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends in Parasitology*. v. 17, n. 7, p. 344-347, 2001.

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*. v.32, p. 46-56, 2004.

MS - Ministério da Saúde. Tabela de óbitos por Doença de Chagas Aguda (DCA). Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2005 – 2007. 2008a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27881. Acesso em: 19/06/2008.

MS – Ministério da Saúde. Nota técnica – Doença de Chagas Aguda. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf . Acesso em: 06/03/2008.

NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. DA . Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali* . *Medical and Veterinary Entomology* v. 20, n. 4, p. 353–357, 2006.

PACHECO, R. S., ALMEIDA, C.E., COSTA, J. , KLISIEWICZ, D. R., MAS-COMA, S., BARGUES, M. D. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). *An. Tropic. Med. & Paras.* v.97, n.7, p. 757-768, 2003.

PACHECO, R.S., ALMEIDA, C.E., KLISIEWICZ, D.R., COSTA, J., PIRES, M.Q., PANZERA, F., BAR, M. E., MAS-COMA, S. & BARGUES, M. D. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite*. v. 14, p. 231–237. 2007.

PINTO, P.L.S. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP. São Paulo. 2000.

PORTER, C. H. & COLLINS, F. H. Phylogeny of Nearctic Members of the *Anopheles maculipennis* Species Group Derived from the D2 Variable Region of 28S Ribosomal RNA. Mol. Phyl. and Evol. v. 6, n. 2, p. 178–188, 1996.

ROSA, J.A. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de 1º e de 5º estádios de *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – São Paulo, 1995.

ROSA, J.A. da; BARATA, J.M.S.; CILENSE, M. & BELDA NETO, F.M. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., v. 28, p. 363-75, 1999.

ROSA, J.A. da, BARATA, J.M.S., SANTOS, J.L.F.; CILENSE, M.. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Saúde Pública v.34, n. 5, p. 538-542, 2000(a).

ROSA, J.A. da; TRES, D.F.A.; SANTOS, J.L.F.; BARATA, J.M.S. Estudo morfométrico dos segmentos antenais de ninfas e adultos de duas colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Entomol. Vectores v.7, p. 255-64, 2000 (b).

RUAS-NETO, A.L.; CORSEUIL, E. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). *Entomologia y Vectores* v. 9, p. 231-249, 2002.

SCHOFIELD, Christopher J. Biossistemática e evolução de triatomíneos. *Cad. Saúde Pública*, v.16, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1 - 3, 1989.

SAINZ, A.C.; MAURO, L.V.; MORIYAMA, E.N. & GARCÍA, B.A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* v.121, p. 229-40, 2004.

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*. v. 1443, p. 55-64, 2007.

SILVEIRA, A.C. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. *Saúde Pública* v. 1, p. 212-8, 1983.

SILVEIRA, A. C. & REZENDE, D. F.,. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.* v. 27, p. 11-22, 1994.

SILVEIRA, A. C.; VINHAES, M. C. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, n.1, p. 405-11, 1998.

SOUZA, A. G.; VALÉRIO-WANDERLEY, D. M.; BURALLI, G. M. & ANDRADE, J. C. R. Consolidation of the control of Chagas' disease in the state of São Paulo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.79, p.125-131, 1984.

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, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2008.

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. v.36, n. 2-3, p. 113-121, 2001.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2007.

XIONG, B. & KOCHER, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). Genome. v. 34, p. 306-311, 1991.

ZHANG, D. X.; SZYMURA, J. M.; HEWITT, G. M. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. v. 40, p. 382-391, 1995.

Anexo I

**Artigo Submetido à Revista Medical and Veterinary
Entomology**

Genetic variability of three populations of *Triatoma rubrovaria* from Southern Brazil evaluated by mitochondrial DNA sequences

C. S. ROCHA, M. T. ALVES, D. L. AMBROSIO, S. GARDIM, R. M. B. CICARELLI
and J. A. DA ROSA

Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
UNESP, Araraquara, Brazil

ABSTRACT. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) can be found throughout the State of Rio Grande do Sul (RS), Brazil, in Uruguay and some regions of Argentina. *T. rubrovaria* has become the most frequently captured triatomine species in the home and presents many phenotype variations. In order to evaluate the genetic variability of this species the nucleotide sequence of mitochondrial Cytochrome B (Cyt B) and 16S ribosomal RNA gene segments were used for taxonomic studies of three different population of *T. rubrovaria*. The Cyt B and 16S gene sequences were analyzed individually and then compared. The Cyt B sequences showed a greater variation than did those of the 16S. Thus Cyt B is a better marker than 16S for the analysis of the genetic variability of *T. rubrovaria*.

KEY WORDS. *Triatoma rubrovaria*, Cytochrome B, 16S ribosomal RNA genes, gene sequences, Triatominae.

CORRESPONDENCE: João Aristeu da Rosa, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil, +55 1633016943; Fax +55 1633016940; E-mail: rosaja@fcfar.unesp.br

Introduction

Chagas disease constitutes one of the most serious public health problems in Latin America. The etiological agent, the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas) is thought to have infected up to 15 million people, and another 28 million live in endemic areas where they are at risk of acquiring the infection (WHO, 2007).

Since the early 1990s interventions made by the World Health Organization (WHO) in cooperation with regional and national control authorities, has contributed to the interruption of the transmission of the disease over sizable areas. Brazil, Chile and Uruguay have been declared free of the transmission of Chagas disease transmission to *Triatoma infestans* (Klug), the main vector in domiciles in these countries (WHO, 2007).

Based on morphological data, Lent & Wygodzinsky (1979) have described 110 species of the subfamily Triatominae, grouped into 5 tribes and 14 genera. Currently 143 species of the subfamily Triatominae, grouped into 6 tribes and 18 genera are recognized (Sandoval *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Costa & Felix, 2007; Bérenger & Blanchet, 2007; Costa *et al.*, 2006; Galvão & Angulo, 2006; Poinar, 2005).

Triatoma rubrovaria (Blanchard) (Hemiptera, Reduviidae), can be found throughout the State of Rio Grande do Sul (RS), Brazil, in Uruguay and some regions of Argentina. It used to be considered sylvatic and as of secondary importance as vector of the agent of the Chagas disease, however, probably due to environmental changes this species has adapted to the domiciliary environment (Silveira, 1983) and in many municipalities in RS large numbers of this insect may be caught (Rosa *et al.*, 2000).

Data gathered by the Brazilian National Health Foundation (Funasa) in the period from 1975 to 1997 indicate an increase in domestic and peridomestic invasions by *T. rubrovaria* in RS (Dias, 2000; Silveira & Vinhaes, 1998).

A proper identification of the Triatominae is important for epidemiological vigilance and the control of Chagas disease, since it allows a more effective strategy to be applied for the control of the vectors.

Some triatomine species are alike in their coloration and morphological characteristics and are thus difficult to identify correctly based in this characteristics (Lent *et al.*, 1993).

Cytogenetic and molecular biological methods have been employed in the taxonomic and systematic study of the Triatominae in order to clarify the limitations of morphological, morphometric, and biochemical classification, (Monteiro *et al.*, 2001).

Several molecular markers may be used to provide information on the genetic variability of triatominae through the detection of DNA polymorphisms. The sequencing of certain genes in order to detect DNA polymorphisms directly provides information for phylogenetic inference as well as enabling us to assess the relationships between organisms and populations.

The mitochondrial DNA (mtDNA) is a relatively simple genome of maternal inheritance, and has a rate of change ten times faster than the replacement of nuclear DNA (Avisé *et al.*, 1987). Differences in the nucleotide sequences in different regions of the mtDNA have also been used to obtain information about the evolutionary relationships and / or population structure of some species of insects.

The aim of this study was to investigate the variability of three *T. rubrovaria* populations from different localities in RS by the analysis of nucleotide sequence of the mitochondrial Cytochrome B (Cyt B) and 16S ribosomal RNA genes.

Material and methods

Acquisition of insects

A total of 30 specimens adults of *T. rubrovaria* were obtained from three colonies (10 of each) maintained in the Insetário de Triatominae at the Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP/Araraquara.

The colony collected in Quaraí (30°22'52"S; 56°25'31"W), state of Rio Grande do Sul (RS) (Figure 1) in 2003 (Martins *et al.*, 2006) had distinct color patterns of pronotum (Figure 2A and 2B) and then they were separated in two populations, Quaraí I (QI) and Quaraí II (QII). The third colony of *T. rubrovaria* was collected in Caçapava do Sul (30°30'44"S; 53°29'29"W) in 1993 (Rosa *et al.*, 2000) (Figure 2C) and is called CS.

DNA extraction

The bug genomic DNA was extracted all six legs were used, previously cleaned with an ethanol 70% solution. The legs were treated with phenol and the DNA was precipitated with 100% ethanol, using the modified Bargues & Mas-Coma *et al.* (1997) procedure.

The legs were first macerated with liquid nitrogen and after in 400µL of lysis buffer (10mM Tris – HCl (pH 8.0), 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS] containing 20µL (10 mg/mL) of Proteinase K (Invitrogen®) and digested for four hours at 55°C with alternate shaking every 30 minutes. Next,

500 μ L of (24:1) phenol:chloroform solution was added at room temperature (RT) in the tube and centrifuged at 20.800g for three min. The supernatant was transferred to another tube and 2 μ L of RNase (10 μ g/100mL) was added and incubate for 30 minutes at 37°C.

After this incubation, 400 μ L of (24:1) phenol: chloroform solution was added at RT in the tube and centrifuged at 20.800g for three minutes. The supernatant was transferred to another tube where 400 μ L of a (25:24:1) solution of phenol: chloroform: isoamyl alcohol was added at RT in the tube and centrifuged at 20.800g for three minutes.

The supernatant was transferred to another tube and 400 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) solution was added and it was centrifuged at 20.800g for three minutes. The aqueous phase was transferred to another tube, where the genomic DNA was precipitated by adding of 40 μ L of 4 M ammonium acetate and 1 mL of cold absolute ethanol and centrifuged at 4°C at 20.800g rpm for ten minutes.

The pellet was washed with 70% ethanol, centrifuged at 20.800g for ten minutes at 4°C, and briefly air dried. The precipitated DNA was dissolved in 50 μ L of TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA).

Amplification of the Cyt B and 16S region

The two target mitochondrial DNA fragments were amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR), resulting in a 363 bp fragment of the Cyt B gene and a 330 bp fragment of the 16S large subunit ribosomal RNA region of the mitochondrial gene.

The DNA fragments were amplified with the following primer combinations (Lyman, 1999): Cyt B (CytB-F: 5' – GGA CAA ATA TCA TTT TGA GGA GCA ACA G – 3') and (CytB-R: 5' – ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G – 3') and 16S mitochondrial gene (16S-F: 5' – CRC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3' and 16S-R: 5' – AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA – 3'), performed in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems™)

The following reactions conditions were used: denaturation at 94°C for 5 min; then 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; followed by a 72°C extension for 7 min, and storage at 4°C indefinitely, for both gene fragments.

The resulting amplicons were separated on a 1.0% agarose gel and the DNA fragments were extracted from the gel with Illustra GFX DNA and Band Purification Kit (GE Life Sciences), following manufacturer's instructions, and sequenced in an ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Wellesley, MA, US), using the Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem).

Data analysis

The DNA sequences obtained, as well as other sequences from the GenBank, were edited with the program BioEdit 7.0.5 and aligned with the program ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; Hall, 1999).

The choice of *T. sherlocki* as outgroup was based on the geographic distance that separates from *T. rubrovaria*, considering that the objective of the study is to characterize the populations of *T. rubrovaria* of the Rio Grande do Sul State.

Results

Large subunit ribosomal RNA (16S)

The amplification of the mtDNA for 16S rRNA generated a fragment with 330 bp for *T. rubrovaria* from Quaraí I and Quaraí II (QI and QII) and a fragment of 309 bp for the colony of *T. rubrovaria* from Caçapava do Sul (CS). After aligning their sequences with the ones from *T. rubrovaria*, *T. circummaculata*, *T. sherlocki* and *T. platensis* obtained in GenBank it was obtained a consensus sequence of 273 bp. This alignment exhibited 28 substitutions, of which 35 were transitions, 12 transversions and 26 polymorphic sites (9,5%) (Table 1).

Cytochrome B (Cyt B)

The amplified fragment of the Cyt B region produced a sequence with 364 bp for *T. rubrovaria* QI, 367pb for *T. rubrovaria* QII and 388 bp for *T. rubrovaria* CS. After aligning this sequences with *T. sherlocki* (outgroup), from GenBank, the consensus sequences obtained presented 360 bp with 108 substitutions, wich 199 were transitions, 90 transversions and 95 polymorphic sites (26,4%) (Table 2). The protein sequences showed 34 non-synonymous changes (Table 3), which correspond to the changes found in the amino acids sequences.

Discussion

Abalos & Wygodzinsky (1951) found in Uruguay and Argentina, five patterns of pronotum for *T. rubrovaria*. Lent & Wygodzinsky (1979) reported the existence of eight color patterns and affirmed that this variation is individual and not geographic. Almeida *et al.* (2002) noted that *T. rubrovaria* collected in different regions of RS presents chromatic variations and four morphotypes.

Three colors patterns of pronotum in specimens captured in Caçapava do Sul (Rosa *et al.*, 2000) and Quaraí in RS (Martins *et al.*, 2006) (Figure 2) were observed. These color patterns are presented for every generations of this populations. Then this observation is according to Abalos y Wygodzinsky, 1951, but in parts disagrees with Lent & Wygodzinsky, 1979. The phenotype of CS colony is distinct of QI and QII (Figure 2). Therefore QI and QII colonies are collected in the same local, Quaraí (Figure 2). Beyond the morphological differences among these three populations, morphometric differences (evaluated by mensuration of head, thorax and abdominal length, interocular, anteocular and postocular distances, diameter of the eye and the lengths of first, second and third rostral segments - Dujardin *et al.*, 1999) with statistical significance verified through the test of Kruskal-Wallis test with multiples comparisons of Dunn like post-test revealed significant differences between the three populations (unpublished data).

Then this genetic variability study was based in these observations. The populations from Quaraí had different morphotypes and pronotum color, which were conserved even after the population was separeted in two, QI and QII, based on color pattern.

Pacheco *et al.*, (2007) studied the genetic variability of populations of *T. rubrovaria* from different localities of RS, using RAPD and rDNA sequence analyses and also detected heterogeneity intra and inter populations.

Giordano *et al.* (2005) used the sequencing of mitochondrial Cytochrome B gene and Garcia *et al.* (2003) analyzed Mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequence for evaluation of genetic variability of distinct populations of *T. infestans*, highlighting the possibility of evaluating the DNA polymorphisms of direct way.

The distinct feature of the three populations of *T. rubrovaria* (CS, QI and QII) may be verified through the mtDNA analysis (Table 3). Polymorphisms intra and inter populations in the alignment of sequences of the 16s rRNA of the colonies QI, QII and CS was observed. In QI and QII colonies two consensus sequences for each population and there is variability intra and inter population was verified while the CS population shows only one consensus sequence, revealing as a homogeneous population, thus presenting only inter population variability (Table 1).

The sequences of Cyt B showed higher intra population polymorphism for QI and QII than that presented by analysis of 16S - QI showed seven patterns while QII showed four patterns of sequence. The CS population again proved to be uniform, showing only a consensus sequence (Table 2).

The homogeneity presented by the CS population in the analysis of the two markers can be justified by the long time of existence of the colony, this it is not recommend its use for studies of variability of populations.

According to the results, it can be then suggested that the Cyt B is a better marker for the analysis of genetic variability than 16S. This study showed that the

morphometric and morphological studies and the sequences analysis are reliable to study the variability intra and inter population. Moreover, these distinct methodologies show the phenotype differences and are complementary to taxonomic studies. Therefore, further studies are necessary to better characterize *T. rubrovaria* populations.

Acknowledgements

For Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and Fundação para o Desenvolvimento da UNESP - FUNDUNESP, that supported the research. Dr Antonio Leite Ruas-Neto, Dra Sirlei Famer, Fernanda de Mello, Maria Amélia Torres, Juvenal Augusto Vieira, Cledir Ribeiro, Carlos Moisés Araújo, Paulino Signes Benites, João Medeiros Soares and Mario Brito de Oliveira from Secretaria de Saúde do Estado Rio Grande do Sul that had collaborated in the Triatominae captures.

References

- Abalos, J. W. & Wygodzinsky. (1951). Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). *Inst. Med Regional*, Tucumán, Monogr. No. **2**, 179 pp., 318 figs.
- Almeida, C.E., Pacheco, R.S., Noireau, F. & Costa, J. (2002). *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97** (6), 829-34.
- Avise, J.A., Arnold, J., Ball, R.M., Berningham, E., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylo-geography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev. Ecol. Syst.* **18**, 489-522.
- Bargues, M. D. & Mas-Coma, S. (1997). Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18S rDNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**(5), 569-577.
- Bérenger, J.M. & Blanchet, D. (2007). A new species of the genus *Panstongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102** (6), 733-736.
- Costa, J. & Felix, M. (2007). *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**, 87-90.
- Costa, J., Argolo, A. & Felix, M. (2006). Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* **1385**, 47-58.
- Dias, J. C. P. (2000) Epidemiologia. In: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral-Neto, M. *Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p.

-
- Dujardin, J.P., Steindel, M., Chavez, T., Machane, M. & Schofield, C.J. (1999). Changes in the Sexual Dimorphism of Triatominae in the Transition from Natural to Artificial Habitats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**(4), 565-569.
- Galvão, C. & Ângulo, V.M. (2006). *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* **1241**, 61-68.
- Garcia, B. A., Manfredi, C., Fichera, L. & Segura, E. L. (2003). Short Report: Variation in Mitochondrial 12s and 16s Ribosomal DNA Sequences in Natural Populations of *Triatoma Infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**(6), 692–694.
- Giordano, R., Cortez, J. C. P., Paulk, S. & Stevens, L. (2005). Genetic Diversity of *Triatoma Infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia Based on the Mitochondrial Cytochrome B Gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **100**(7), 753-760.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **163**, 123-520.
- Lent, H., Jurberg, J. & Galvão, C. (1993). *Rhodnius stali* n. Sp. afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88**, 605-14.
- Lyman, D.F., Monteiro, F.A., Escalante, A.A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D.M., Dujardin, J.P. & Beard, C.B. (1999). Mitochondrial DNA sequence variation

- among triatomine vectors of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. & Hyg*, **60** (3), 377-386.
- Martins, P. A. M., Castanho, R. E. P., Casanova, C., Caravelas, D. T., Frias, G. T., Ruas-Neto, A. L. & Rosa, J. A. (2006). Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**(2), 198-202.
- Martínez, E., Chávez, T., Sossa, D., Aranda, R., Vargas, B. & Vidaurre, P. (2007). *Triatoma boliviensis* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo* **3** (1), 1-11.
- Monteiro, F. A. , Escalante, A. A. & Beard, C. B. (2001) Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective . *Trends in Parasitology* , **17** , 344 – 347 .
- Pacheco, R.S., Almeida, C.E., Klisiowicz, D.R., Costa, J., Pires, M.Q., Panzera, F., Bar, M. E., Mas-Coma, S. & Bargues, M. D. (2007). Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite*. **14**, 231–237.
- Poinar, G. Jr. (2005). *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a Triatomine-Trypanosomatid vector association. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **5** (1), 72-81.
- Rosa, J.A. da, Barata, J.M.S., Santos, J.L.F. Cilense, M. (2000). Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Saúde Pública* **34**(5), 538-542.

- Sandoval, C.M., Pabón, E., Jurberg, J. & Galvão, C. (2007). *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.
- Silveira, A. C. & Vinhaes, M. C. (1998). Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (I), 405-11.
- Silveira, A.C. (1983). Epidemiologia e controle da doença de Chagas. *Saúde Pública* **1**, 212-8.
- Thompson, J.D., Higgings, D.G. & Gibbison T.J. (1994). CusltalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- World Health Organization (2007). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.



Figure 1: Regions of capture of *Triatoma rubrovaria* in the Rio Grande do Sul State, Brazil (Rosa *et al.*, 2000, modified).



Figure 2. A – *T. rubrovaria* QI, B – *T. rubrovaria* QII, C – *T. rubrovaria* CS

Table 1. Variable sites in 273 bp of the mitochondrial 16S gene for three populations of *T. rubrovaria*.

[illegible]

Table 2. Variable sites in 360bp mitochondrial Cyt B gene for three populations of *T. rubrovaria*.

[illegible]

C1 = consensus 1; C2= consensus 2; C3= consensus 3; C4= consensus 4; C5= consensus5; C6= consensus6; C7= consensus 7; ; QI = Quarai I; QII = Quarai II;
CS = Cacapava do Sul; * accession number in GenBank

Table 3: Sequence alignment of 120 aminoacids of mitochondrial Cyt B gene for 3 populations of *T. rubrovaria*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
<i>T. rubrovaria</i> QII C1	I*VMS*NDY	EE?FSVDNAT	LIRFALHFL	LEFFIAALTM	IHLLELHQTG	SNNPLGLTSN	SDKIEFHEYF	SIKDLMGVSI	TLMLFIMNL	WEPRILGDPE	NFIPANPLVT	PVHIQPEWYF
<i>T. rubrovaria</i> QII C2	T*G...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QII C3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> QI C7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. rubrovaria</i> CS	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>T. sherlocki</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

C1 = consensus 1; C2= consensus 2; C3= consensus 3; C4= consensus 4; C5= consensus5; C6= consensus6; C7= consensus 7; ; QI = Quarai I; QII = Quarai II;
CS = Caçapava do Sul;