

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/07/2017.



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia**

ROSSANA FALCONE

**Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera,
Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de
marcadores mitocondriais, morfológicos e morfométricos**

Araraquara, SP

2016

ROSSANA FALCONE

Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de marcadores mitocondriais, morfológicos e morfométricos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área de pesquisa em Parasitologia, subárea Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara, SP

2016.

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F182e Falcone, Rossana
Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de marcadores mitocondriais, morfológicos e Morfométricos / Rossana Falcone. – Araraquara, 2015.
81 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, área de pesquisa em Parasitologia, subárea Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. *Rhodnius*. 2. Taxonomia. 3. Citocromo b. 4. Morfologia. 5. Morfometria geométrica.
I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

"Esse é o segredo, eu acho. Você não precisa de ideias fixas sobre quem você é ou para onde você vai. Você não precisa de ofertas, notas ou carimbos de aprovação. Você só precisa estar preparado para qualquer coisa que vier." Rae (My Mad Fat Diary)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que apesar de todas as adversidades da vida nunca se deixaram abater, a vocês a minha eterna gratidão por todos os valores passados, os sacrifícios feitos e o apoio incondicional.

Agradecimentos

À Deus, pela saúde e força para superar as adversidades.

Aos meus pais, Valmir e Rosi, agradeço por todos os sacrifícios feitos em prol da minha formação pessoal e profissional. E pelo apoio que tornou possível essa conquista em minha vida acadêmica.

À minha irmã, Isabela, pelo apoio e por ser um exemplo de dedicação profissional.

À Mariana, Maria Clara e Paulo, por terem se tornado parte da minha família e sempre me apoiado.

Ao Gustavo Monnazzi, exemplo de caráter e profissionalismo, por ter despertado meu interesse pela Parasitologia e por todos os conselhos ao longo do caminho.

À Juliana Oliveira Faccio, pela amizade, incentivo e conselhos.

Ao meu orientador Dr. João Aristeu da Rosa, por ter aceitado me orientar e ter sido sempre tão presente e solícito ao longo do desenvolvimento deste trabalho. E por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.

À Aline, Dennys, Juliana e Mariana, pela amizade sincera, apoio e risadas.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia da FCFar/UNESP, por todo o apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Vagner José Mendonça, pela contribuição de grande valor durante a realização deste trabalho.

Aos participantes da banca do Exame de Qualificação, Dra. Aline Rimoldi e Dr. Marcos Obara pelas sugestões que foram de grande valia neste trabalho.

À Secretaria e Coordenação da Pós-graduação que tornam possível o desenvolvimento de nossos trabalhos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar/UNESP por ceder toda estrutura física para realização deste trabalho.

Resumo

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* no mundo, a maioria na América Latina, sendo a transmissão vetorial responsável ainda por, aproximadamente, 80% dos casos. Atualmente são descritas 151 espécies de triatomíneos agrupadas em cinco tribos formadas por 18 gêneros. O gênero *Rhodnius* conta com 19 espécies de potenciais vetores, podendo veicular *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. É considerado um dos gêneros taxonomicamente mais complexos da subfamília Triatominae, devido as semelhanças morfológicas e a distribuição geográfica que podem se sobrepor entre algumas de suas espécies dificultando seu estudo, apesar das diversas técnicas empregadas para sua distinção. Com o desenvolvimento atual das técnicas moleculares tornou-se possível a caracterização de espécies de triatomíneos por meio de marcadores mitocondriais e nucleares, tendo essa se tornado uma variável a mais para a taxonomia dos triatomíneos, assim como a já utilizada morfologia e a recentemente popularizada morfometria geométrica. A adição de novas variáveis possibilita que dados já existentes possam ser comprovados e/ou corrigidos. Neste trabalho foram obtidos subsídios que ampliam o conhecimento e que agregados aos já existentes podem proporcionar uma diferenciação mais minuciosa e precisa de espécies englobadas no gênero *Rhodnius*, de modo a contribuir para estabelecer uma classificação mais apropriada. A obtenção dos dados foi conduzida, por meio de estudo molecular, utilizando-se os marcadores mitocondriais – *citocromo b* e *citocromo oxidase I*, além de estudos morfológicos, utilizando-se como caracteres o processo mediano do pigóforo, o ângulo ânterolateral e a presença de colarinho nos ovos, a morfometria geométrica da cabeça também foi empregada, a fim de se distinguir populações de *R. neglectus* e *R. prolixus*. Os resultados obtidos a partir dessa análise multiparamétrica sugeriram que, as colônias identificadas como *Rhodnius prolixus* pertencem à espécie, que algumas colônias de *R. neglectus* analisadas apresentaram padrões condizentes com *R. prolixus*, já as demais apresentaram padrões condizentes com a espécie.

Palavras-chave: *Rhodnius*. Taxonomia. Citocromo b. Morfologia. Morfometria geométrica.

Abstract

Worldwide, it is estimated that 6 to 7 million people are infected with *Trypanosoma cruzi*, mostly in Latin America and the vector transmission is still responsible for approximately 80% of the cases. There are currently 151 described species of triatomine, grouped into five tribes, formed by 18 genres. The *Rhodnius* genre includes 19 species, which can transmit *T. cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. It is considered one of the most complex taxonomically genera of Triatominae, due to its morphological similarities and geographical distribution that may overlap among some species hindering their study, despite the various techniques used for their distinction. With the current development of molecular techniques it has become possible to characterize triatomine species through mitochondrial and nuclear markers, this became one more toll for the taxonomy of triatomines, just as the already used morphology and recently popularized geometric morphometry. The addition of new variables enables the verification and or correction of existing data. This work has generated valueable data that amplify the knowledge which in addition to the existing may provide a more accurate differentiation of species included in the genre *Rhodnius*, in order to help establish a more appropriate classification. Data collection was performed by DNA analysis, using mitochondrial markers - *cytochrome b* and *cytochrome oxidase I*, in addition to morphological parameters, as, median process of pygophore, the anterolateral angle and the presence of collar in eggs, geometric morphometry of the head was also used in order to help distinguish populations of *R. neglectus* and *R. prolixus*. The results obtained from this multiparameter analysis suggested that colonies identified as *R. prolixus* belong to the species, a few colonies of *R. neglectus* analyzed showed consistent patterns with *R. prolixus*, the others colonies of *R. neglectus* showed consistent patterns to the species originally identified.

Keywords: *Rhodnius*. Taxonomy. Cytochrome b. Morphology. Geometric morphometry.

Lista de figuras	Pág.
Figura 1. Representação do ciclo biológico da doença de Chagas (Modificado de CDC, 2015).	16
Figura 2. Distribuição de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , mundialmente, de 2006 a 2009 (Modificado de WHO, 2016).	18
Figura 3. Espécies de triatomíneos classificados segundo sua adaptação à habitações humanas (Silveira, 2000).	20
Figura 4. Distribuição de algumas das espécies do gênero <i>Rhodnius</i> na América Latina. (Reprodução parcial de Jurberg & Galvão, 2006).	22
Figura 5. Mapa parcial da distribuição de <i>R. prolixus</i> na América Central e do Sul, destacando a presença do vetor na Colômbia, Costa Rica, Nicarágua e Venezuela (Belinato, 2014).	23
Figura 6. Mapa da distribuição da espécie <i>R. neglectus</i> no Brasil (Jurberg et al., 2014)	24
Figura 7. Esquema comparativo do processo mediano do pigóforo das espécies: <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> (Modificado de Galvão, 2014).	25
Figura 8. Microfotografia da região pré-opercular de ovos de <i>R. neglectus</i> (A) e <i>R. prolixus</i> (B) evidenciando a presença ou ausência de “colarinho” (Forattini e Barata, 1974).	26
Figura 9. Pronoto, em destaque a estrutura ângulo ânterolateral (Modificado de Galvão, 2014).	26
Figura 10. Imagem retratando <i>Rhodnius neglectus</i> (A) e <i>Rhodnius prolixus</i> (B), com ângulo anterolateral em destaque (Lent e Wygodzynski, 1979).	27
Figura 11. Localização da procedência das colônias de <i>R. prolixus</i> utilizadas no estudo (Modificado de Google Earth).	30
Figura 12. Localização da procedência das colônias de <i>R. neglectus</i> utilizadas no estudo (Modificado de Google Earth).	31
Figura 13. Cabeça de <i>Rhodnius neglectus</i> retratando as 8 landmarks selecionadas para a realização da morfometria geométrica. Os pontos 1, 2, 5 e 6 são do tipo I (justaposição de tecidos) e os pontos 3, 4, 7 e 8 do tipo II (máxima curvatura).	36
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando peso molecular GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, corada com gel red. As amostras foram obtidas a partir da extração do DNAg das populações avaliadas. Sendo A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 65, F.CTA 67, G.CTA 68, H.CTA 229, I.CTA 73, J.CTA 74, K.CTA 78, L.CTA 79 e M.CTA 81.	36
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando peso molecular	37

GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, corado com gel red, evidenciando as bandas amplificadas referentes ao fragmento Cytb. Sendo A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 65, F.CTA 67, G.CTA 68, H.CTA 229, I.CTA 73, J.CTA 74, K.CTA 78, L.CTA 79 e M.CTA 81.	
Figura 16. Representação do alinhamento das sequências do fragmento do gene Cytb (700pb) obtidas no estudo e coletadas do GenBank®. Na legenda da figura o número de CTA das espécies estudadas.	38
Figura 17. Dendograma filogenético do fragmento do gene Cytb, baseado na análise <i>Neighbor-Joining</i> . Sequências referentes às CTAs estudadas com adição de sequências disponíveis no GenBank®.	39
Figura 18. Imagens captadas de ovos em aumento 50x, para avaliação da existência de “colarinho” em colônias identificadas como <i>R. neglectus</i> . É possível notar a ausência de colarinho em A (CTA 58), F (CTA 67) e G (CTA 68). E presença de colarinho em B (CTA 61), C (CTA 62), D (CTA 63), E (CTA 65) e H (CTA 229).	40
Figura 19. Imagens captadas de ovos em aumento 50x, para avaliação da existência de “colarinho” em colônias identificadas como <i>R. prolixus</i> . É possível notar a ausência de colarinho em A (CTA 73), B (CTA 74), C (CTA 78), D (CTA 79) e E (CTA 81).	40
Figura 20. Imagens captadas em aumento de 40x para avaliação do processo mediano do pigóforo das populações de interesse de <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> . Sendo <i>R. neglectus</i> : A. CTA 58, B. CTA 61, C. CTA 62, D. CTA 63, E. CTA 65, F. CTA 67, G. CTA 68 e H. CTA 229 e <i>R. prolixus</i> : I. CTA 73, J. CTA 74, K. CTA 78, L. CTA 79 e M. CTA 81.	41
Figura 21. Imagem capturada com aumento de 12,5x evidenciando o padrão dos ângulos anterolaterais das colônias estudadas de <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> . <i>R. neglectus</i> : A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 63, F.CTA 65, G.CTA 229, H.CTA 67 e I.CTA 68. <i>Rhodnius prolixus</i> : J.CTA 73, K.CTA 74, L.CTA 78, M.CTA 79 e N. CTA 81.	42
Figura 22. Mapa fatorial da análise discriminante da cabeça dos triatomíneos estudados de colônias identificadas como <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> .	43
Figura 23. As <i>landmarks</i> quando conectadas demonstram a existência de dois padrões de cabeça nas colônias estudadas.	43

Lista de tabelas	Pág.
Tabela 1. Colônias utilizadas, sua procedência, ponto de coleta e data de início das CTA.	30
Tabela 2. Iniciadores utilizados nas ampliações de seus respectivos genes e temperatura de anelamento utilizada.	32
Tabela 3. Códigos de acesso das sequências coletadas no Genbank® do gene mitocondrial Cytb.	37
Tabela 4. Representação dos resultados obtidos pelas diversas técnicas utilizadas, sendo que a cor azul corresponde ao padrão de <i>R. neglectus</i> e a cor vermelha de <i>R. prolixus</i>	44

Lista de abreviaturas e siglas

% - porcentagem.

12S/16S – genes de subunidades ribossomais do mtDNA.

COI – citocromo oxidase I do mtDNA.

CP1 e CP2 – Componentes principais.

CTA – Colônia de Triatominae de Araraquara.

Cytb – citocromo b do mtDNA.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

DNAg – DNA genômico.

DNTP – desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP).

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid – ácido etilenodiamino tetra-acético.

F – sequência forward.

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

GenBank® - banco de dados público de sequências de nucleotídeos.

ITS 1 e 2 – Espaçador interno transcrito I e II.

Kb – kilobase (1000 bases).

M – molar.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

mL – mililitro.

mM – milimolar.

mtDNA- ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

nDNA – DNA nuclear.

PCR - Polymerase Chain Reaction.

pb - pares de base.

R – sequência reverse.

rpm – Rotações por minuto.

SDS – Dodecil sulfato de sódio.

TE/TAE – solução tampão.

Tris – HCl – Tris-Ácido clorídrico.

U – unidade.

μL – microlitro

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Capítulo I – Dissertação de mestrado

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A doença de Chagas	16
1.2. Vetores	19
1.3. O gênero <i>Rhodnius</i>	20
1.4. Morfologia	24
1.4.1. Genitália masculina – Processo mediano do pigóforo	25
1.4.2. Ovos	25
1.4.3. Ângulo ânterolateral	26
1.5. Morfometria geométrica	28
1.6. Biologia molecular	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Triatomíneos	31
3.2. Estudos moleculares	32
3.2.1. Extração do DNA genômico	32
3.2.2. Iniciadores (Primers)	33
3.2.3. Amplificação dos fragmentos por PCR	34
3.2.4. Purificação e sequenciamento do DNA amplificado	35
3.3. Análise filogenética	35
3.4. Morfologia	36
3.4.1. Ovos	36
3.4.2. Processo mediano do pigóforo (genitália masculina)	36
3.4.3. Ângulo ânterolateral	36

3.5. Morfometria geométrica _____	37
4. RESULTADOS _____	38
4.1. Extração do DNA genômico _____	38
4.2. Amplificação (PCR) dos fragmentos de Citocromo B (Cytb) e Citocromo Oxidase I (COI) _____	38
4.3. Sequências _____	39
4.4. Análise filogenética _____	41
4.5. Morfologia _____	42
4.5.1. Presença ou ausência de colarinho _____	42
4.5.2. Processo mediano do pigóforo (genitália masculina) _____	43
4.5.3. Ângulo ânterolateral _____	43
4.6. Morfometria geométrica _____	44
5. DISCUSSÃO _____	47
6. CONCLUSÃO _____	50
REFERÊNCIAS _____	51

Capítulo II – Artigo

Capítulo I - Dissertação

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

Oswaldo Cruz foi incumbido do combate a um surto de malária que estava impedindo a progressão dos trabalhos de construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, prontamente designando Carlos Chagas para o trabalho clínico-profilático na ponta dos trilhos da estrada, na localidade de Lassance, MG. Em suas observações nos doentes encontrou não só sintomas de malária, mas também outros diferentes dos característicos da epidemia fazendo com que ele começasse uma investigação sobre, que culminou na descrição da doença, publicada em 1909 (LENT, 1999).

O médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas relatou a cadeia epidemiológica dessa zoonose, desde o agente etiológico ao primeiro caso humano, Berenice, primeira pessoa encontrada com a doença. Devido a esse trabalho inigualável a doença foi então nomeada em sua homenagem. A tripanossomíase é uma zoonose e está endemicamente distribuída desde o sul dos EUA à Patagonia Argentina. Seu agente etiológico é o parasito *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado (CHAGAS, 1909; YEO et al., 2005; CERETTI-JUNIOR et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; WHO, 2015).

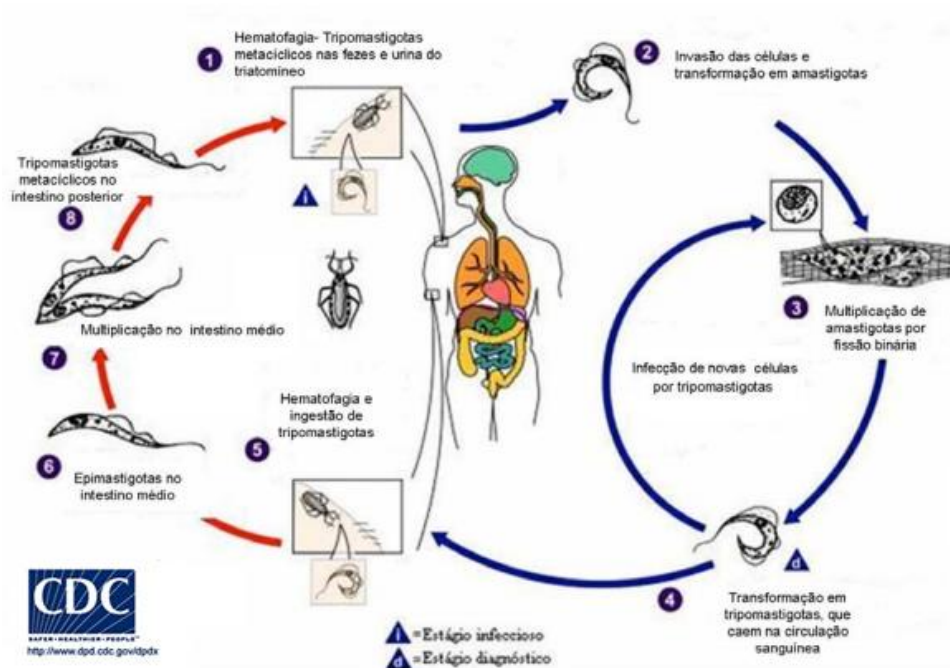


Figura 1. Representação do ciclo biológico da doença de Chagas (Modificado de CDC, 2015).

A infecção dos seres humanos ocorre prioritariamente pelo contato de sua pele lesada, ou mucosa com as fezes contaminadas do vetor, sendo a forma o tripomastigota metacíclico de *T. cruzi*, que são eliminadas durante o hematofagismo do triatomíneo. O ciclo biológico (Fig.1) tem início após a forma infectante penetrar e atingir a via sanguínea, chegando por meio dessa aos tecidos que irá infectar. Ao invadir as células o tripomastigota se transforma em amastigota (forma de multiplicação no organismo vertebrado), após se multiplicar por inúmeras vezes os amastigotas causam a lise celular, ao voltar ao espaço extracelular eles reassumem a forma de tripomastigotas, dando continuidade a multiplicação dos parasitos no organismo.

Quando um triatomíneo não infectado realiza o hematofagismo em um hospedeiro infectado pode sugar juntamente com o sangue as formas infectantes tripomastigotas. Ao adentrar o sistema digestivo do triatomíneo, mais especificamente a porção média de seu intestino, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas (forma de multiplicação no hospedeiro invertebrado) e começam a se multiplicar. Na porção final do intestino do vetor as formas epimastigotas assumem novamente a forma de tripomastigota, assim quando forem eliminadas no próximo repasto podem dar continuidade ao ciclo da doença.

A transmissão vetorial corresponde ainda à, aproximadamente, 80% dos casos da doença de Chagas (DC), a gravidade da infecção depende da idade do indivíduo infectado, condições físicas e nutricionais e está relacionada também à linhagem do parasito (ARAS et al., 2003; GARDIM, 2010; FERREIRA-FILHO et al., 2011).

A DC tornou-se um problema para a saúde humana a partir da domiciliação dos triatomíneos que, devido ao seu ecleatismo alimentar, sobrevivem com qualquer tipo de sangue, esse fenômeno proporcionou a dispersão da DC. Características próprias do vetor favorecem sua presença e prevalência no ambiente, como, por exemplo, a capacidade de colonização de diferentes ecótopos e de dispersão da espécie, o ecleatismo e preferências alimentares, capacidade e velocidade de sucção e defecção além da intensidade da fotofobia, que ainda aliadas às baixas condições sociais e ação desordenada do homem sobre o meio ambiente tornam ou não possível que uma determinada espécie seja transmissora de *T. cruzi* (BRENER et al., 2000; ARAS et al., 2003; WESTPHALEN et al., 2012).

Além da transmissão vetorial existem ainda outras vias de transmissão como a transfusão sanguínea, os acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e as via oral e congênita (ARAS et al., 2003; FERREIRA-FILHO et al., 2011). As transmissões transfusionais, por transplante e congênita ganharam destaque após o aparecimento de casos

em países onde não há relatos da existência de transmissão vetorial, como mostrado a seguir (Fig. 2)

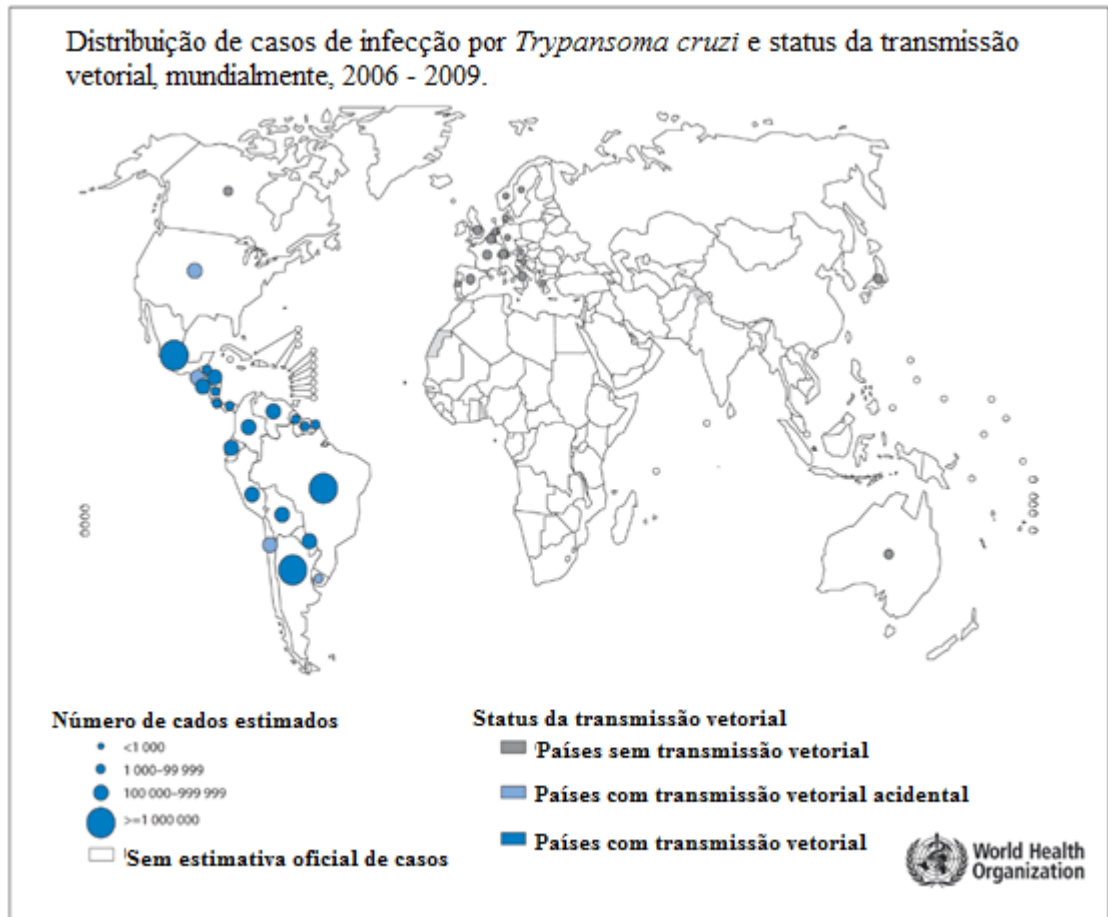


Figura 2. Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, mundialmente, de 2006 a 2009 (Modificado de WHO, 2016).

No Brasil, a transmissão oral vem chamando atenção devido ao aumento dos surtos de DC, associado principalmente ao consumo de caldo de cana-de-açúcar e açaí contaminados com o *T. cruzi*. Os Estados da Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Estados da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Matos Grosso, Amapá, Pará e Tocantins) já notificaram a ocorrência em seu território de surtos de DC advindos de transmissão oral (Mendonça, 2011).

No Século XX, *Triatoma infestans* foi responsável pela grande transmissão vetorial da doença no Brasil, país que foi pioneiro no combate à endemia chagásica. Estimulou pesquisadores, dos diversos países do continente americano, a pressionar a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) a responsabilizar-se pelo combate à doença e coordenar ações para eliminar os triatomíneos das Américas (WESTPHALEN et al., 2012).

De 1994 à 2009 a incidência da transmissão de *T. cruzi*, teve uma diminuição estimada em 73% e houve uma diminuição significativa no número de parasitados na América do Sul. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, a maioria na América Latina. A queda na incidência da transmissão deve-se principalmente à adoção de medidas de combate ao inseto vetor e implantação de diagnósticos imunológicos nos bancos de sangue a partir dos anos 70 e 80 tornando legalmente obrigatória a avaliação sorológica, nos Países do Cone Sul, dos doadores previamente à transfusão (DIAS & SCHOFIELD, 1998; ABAD-FRANCH et al., 2009; YOSHIDA, 2009; SANTOS et al., 2009; WHO, 2015).

1.2 Vetores

Atualmente são descritas 151 espécies de triatomíneos agrupadas em cinco tribos formadas por 18 gêneros. Ainda que a descrição da subfamília Triatominae preconize o conceito de hematofagia obrigatória, é sabido atualmente que os triatomíneos podem se alimentar da hemolinfa de outros insetos (FORERO et al. 2004; NEVES, 2012; ROSA et al. 2012; GONÇALVES et al. 2013; GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al., 2016).

As espécies são descritas e classificadas baseando-se em critérios morfológicos que levam em consideração a coloração do conexivo e pronoto, a morfologia e morfometria dos ovos e das estruturas do corpo e a genitália do macho que permitem definir tribos, gêneros e espécies (LENT & WYGODZYNSKY, 1979).

Todas as espécies de triatomíneos são vetores potenciais de *T. cruzi*, mas apenas em alguns casos as condições para transformar a espécie em um vetor de fato, são preenchidas, condições definidas como: adaptar-se a habitações humanas, elevado grau de antropofilia, curto período de tempo entre o hematofagismo e a defecação e ampla distribuição geográfica (LENT e WYGODZINSKY, 1979).

De acordo com Gaunt e Miles (2000), os três gêneros mais importantes de triatomíneos, do ponto de vista epidemiológico, são: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*.

Silveira (2000) descreve em seu trabalho que várias categorizações têm sido feitas no sentido de melhor orientar as operações de controle do triatomíneo, sendo o mais importante o agrupamento em função da maior ou menor adaptação ao domicílio (Fig. 3), uma vez que servem à determinação da maior ou menor importância relativa de cada uma das espécies na transmissão da doença ao homem. Ele destaca ainda que mudanças ambientais, inclusive aquelas decorrentes das próprias ações de controle, podem implicar o reposicionamento de

determinada espécie, portanto qualquer classificação que se venha a fazer estará sempre sujeita a revisão.

Algumas espécies de triatomíneos segundo sua adaptação à habitação humana.	
Situação	Espécie
Espécies estritamente domiciliadas, ausentes ou raramente detectadas em ecótopos silvestres	<i>Triatoma infestans</i> <i>Triatoma rubrofasciata</i>
Espécies capturadas tanto em ecótopos silvestres como artificiais, com constituição frequente de colônias domiciliares	<i>Rhodnius prolixus</i> <i>Rhodnius pallescens</i> <i>Panstrongylus megistus</i> <i>Triatoma brasiliensis</i> <i>Triatoma dimidiata</i> <i>Triatoma maculata</i> <i>Triatoma longipennis</i> <i>Triatoma pseudomaculata</i> <i>Triatoma sórdida</i> <i>Triatoma Guasayana</i>
Espécies capturadas em domicílios, mas ainda predominantemente silvestres	<i>Triatoma rubrovaria</i> <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius nasustus</i> <i>Rhodnius neglectus</i> <i>Rhodnius pictipes</i> <i>Triatoma vitticipes</i>
Espécies silvestres, com exemplares adultos eventualmente encontrados em domicílio	<i>Triatoma protracta</i> <i>Triatoma tibiamaculata</i> <i>Triatoma melanocephala</i> <i>Triatoma pallidipennis</i> <i>Triatoma platensis</i> <i>Rhodnius robustus</i> <i>Rhodnius domesticus</i> <i>Panstrongylus geniculatus</i>
Espécies exclusivamente silvestres	<i>Alberprosenia</i> sp <i>Belminus</i> sp <i>Cavernicola</i> sp <i>Mepraia</i> sp

Figura 3. Espécies de triatomíneos classificados segundo sua adaptação à habitações humanas (adaptado de Silveira, 2000).

1.3 O gênero *Rhodnius*

Composto por 19 espécies de potenciais vetores, o gênero *Rhodnius* é considerado um dos gêneros taxonomicamente mais complexos na subfamília Triatominae. As espécies do gênero *Rhodnius* possuem padrões definidos em relação à biologia, pois a maioria das espécies é silvestre; vivem em folhagens de palmeiras, buracos de árvores, sugando sangue de aves, roedores e morcegos, depositam seus ovos aderidos ao substrato o que favorece a sua dispersão, passiva e ativa, pois muitas aves que nidificam nas palmeiras possuem hábitos migratórios.

Além das aves, os ovos podem permanecer aderidos as folhas de palmeira que são usadas pela população indígena e rural para cobertura de casas o que pode favorecer a colonização da habitação pelo inseto. Diversos estudos adotaram abordagens para definir melhor as diferentes espécies de *Rhodnius* e suas inter-relações. Como exemplo desses estudos, destaca-se o estudo de ovos, aparelho genital, a morfologia da glândula salivar, de

DNA ribossomal, biogeografia e filogenia e pela coloração homogênea tendendo sempre para castanho claro/escuro, com manchas mais ou menos acentuadas (Santos e Coimbra Jr, 1994; Jurberg et al., 2009; Santos et al., 2009; Rosa et al. 2012).

O gênero *Rhodnius* Stål segundo Carcavallo et al. (2000) é dividido em complexos: o complexo *Rhodnius pictipes* é composto por duas espécies: *R. pictipes* e *R. stali*; o complexo *Rhodnius prolixus* possui cinco espécies: *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*, *R. nasutus* e *R. domesticus*; o complexo *R. pallescens* com três espécies: *R. ecuadoriensis*, *R. colombiensis* e *R. pallescens*. E outro possível complexo é o *R. dalessandroi*, com a espécie *R. dalessandroi* e *R. milesi*. Algumas espécies não possuem os caracteres morfológicos necessários para constituir um complexo, são elas: *R. amazonicus*, *R. brethesi*, *R. neivai* e *R. paraensis* (CARCAVALLO et al., 2000).

Novas espécies que vem sendo descritas estão sendo realocadas de acordo com suas características, *Rhodnius montenegrensis*, por exemplo, possuem características para integrar o complexo *R. prolixus*, já *R. zeledoni* possui características que o agrupam a *R. paraensis*, este porém não possui características necessárias para constituir um complexo. *R. barretti*, não foi ainda alocado em nenhum complexo, assim como outras espécies (JURBERG, 2009; ROSA et al. 2012; ABAD-FRANCH et al., 2013).

As semelhanças morfológicas e a distribuição geográfica que podem se sobrepor entre algumas espécies de *Rhodnius* (Fig. 4) dificultam seu estudo, apesar de diversas técnicas empregadas para sua distinção (SOARES et al., 2000). Portanto, se faz necessário a validação de técnicas complementares para que espécies com grandes semelhanças morfológicas sejam identificadas sem maiores problemas.

<i>Rhodnius amazonicus</i> ALMEIDA, SANTOS & SPOSINA 1973	Brazil, French Guyana
<i>Rhodnius brethesi</i> MATTA 1919	Brazil, Colombia, Venezuela
<i>R. colombiensis</i> MEJIA, GALVÃO & JURBERG 1999	Colombia
<i>R. dalessandroi</i> CARCAVALLO & BARRETO 1976	Colombia
<i>R. domesticus</i> NEIVA & PINTO 1923	Brazil
<i>R. ecuadoriensis</i> LENT & LEÓN 1958	Ecuador, Peru
<i>R. milesi</i> CARCAVALLO, ROCHA, GALVÃO & JURBERG 2001	Brazil
<i>R. nasutus</i> STÅL 1859	Brazil
<i>R. neglectus</i> LENT 1954	Brazil
<i>R. neivai</i> LENT 1953	Colombia, Venezuela
<i>R. pallescens</i> BARBER 1932	Belize, Colombia, Costa Rica, Panama
<i>R. paraensis</i> SHERLOCK, GUITTON & MILES 1977	Brazil
<i>R. pictipes</i> STÅL 1872	Belize, Brazil, Colombia, Ecuador, Guyana, French Guyana, Peru, Suriname, Trinidad, Venezuela
<i>R. prolixus</i> STÅL 1859	Bolivia, Brazil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Ecuador, Guatemala, Guyana, French Guyana, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Suriname, Trinidad, Venezuela
<i>R. robustus</i> LARROUSSE 1927	Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, French Guyana, Peru, Venezuela
<i>R. stali</i> LENT, JURBERG & GALVÃO 1993	Bolivia, Brazil

Figura 4. Distribuição de algumas das espécies do gênero *Rhodnius* na América Latina. (Reprodução parcial de JURBERG & GALVÃO, 2006)

Rhodnius prolixus Stal possui papel de destaque como principal vetor da doença de Chagas em algumas áreas da América Central e Norte da América do Sul, na Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa, a espécie pode ser encontrada em dezesseis países da América Latina, além de algumas regiões da Amazônia, é possível observar sua distribuição parcial abaixo (Fig. 5) (JURBERG & GALVÃO, 2006).



Figura 5. Mapa parcial da distribuição de *R. prolixus* na América Central e do Sul, destacando a presença do vetor na Colômbia, Costa Rica, Nicarágua e Venezuela (BELINATO, 2014).

Em países como Venezuela e Colômbia, *R. prolixus* é silvestre, habitando principalmente as copas de palmeiras porém, em algumas áreas, já pode ser encontrado bem estabelecido no intradomicílio. Em partes da América Central, como Guatemala, Honduras e El Salvador, apresenta hábitos quase que exclusivamente domésticos, aumentando seu destaque no papel de vetor (SCHOFIELD, 1994; ROSA et al., 2010; ABAD-FRANCH & MONTEIRO 2007 apud DIAS, 2002).

Rhodnius neglectus Lent, 1954, é considerada uma espécie silvestre, apesar de já ter sido encontrada em habitações humanas e possuir papel secundário na transmissão da DC (ROSA et al., 2010; ROSA et al, 2014). Esta espécie está entre as que vêm ocupando nichos vagos após o controle de *Triatoma infestans* no Estado de Goiás (SANTANA, 2006). Sua primeira citação foi realizada por Lent (1954), que descreveu a espécie a partir de exemplares coletados em palmeiras do gênero *Attalea* em Minas Gerais.

Entre as espécies do gênero *Rhodnius*, *R. neglectus* é a que está mais amplamente distribuída pelo Brasil, no Distrito Federal e mais 11 estados (GO, MS, MT, BA, PI, PE, MA, TO, MG, PR e SP), como evidenciado na figura 6, sendo característica do bioma Cerrado. Não há registros de ocorrência de *R. neglectus* fora do Brasil. Em São Paulo, Minas Gerais,

Goiás, Tocantins e Paraná foram registradas invasões no peri e intradomicílio por essa espécie que tem apresentado baixos índices de infecção por *T. cruzi* (GURGEL-GONÇALVES e CUBA, 2007). No ambiente silvestre a espécie encontra-se associada a várias espécies de palmeiras como “babaçu” e “macaúba”, utilizando como fonte alimentar aves, marsupiais e roedores. Já no peridomicílio é encontrada principalmente em galinheiros (GALVÃO et al. 2003, GURGEL-GONÇALVES, 2008).

Em território paulista, no período de 1990 a 1999, foram coletados 3.149 exemplares de *R. neglectus*, sendo 2.542 no intradomicílio e 607 no peridomicílio, com índices de infecção por *T. cruzi* de 0,34% e 0,24%, respectivamente (RODRIGUES et al., 2009). Em 2009 em Araçatuba foram encontrados *R. neglectus* colonizando palmeiras e invadindo domicílios, o mesmo foi encontrado em 2012 em Monte Alto (CARVALHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014)



Figura 6. Mapa da distribuição da espécie *R. neglectus* no Brasil (Jurberg et al., 2014)

1.4 Morfologia

A identificação específica e a sistemática dos triatomíneos têm se pautado principalmente em observações morfológicas, em especial por meio de microscopia de luz. No caso de populações de morfologia próximas, quando não é possível identificar a espécie somente com os critérios morfológicos clássicos, é necessária, portanto, a utilização de outras abordagens morfológicas e moleculares como, por exemplo, o estudo das genitálias masculina e feminina, da ultraestrutura de caracteres de valor taxonômico, a análise comparativa de estruturas por morfometria geométrica e análises moleculares para identificação destas espécies (NEVES, 2012; OLIVEIRA, 2015).

1.4.1 Genitália masculina – Processo mediano do pigóforo

A genitália apresenta diversas estruturas que podem ser úteis na diferenciação de gêneros e espécies. Em 1926, Pinto observou o falo, os “ganchos” (parâmeros) e a “espinha” (processo mediano do pigóforo). Posteriormente os estudos foram ampliados para as genitálias de ambos os sexos e a partir de 1965, com os trabalhos de Lent & Jurberg as diversas estruturas fállicas das genitálias passaram a ser analisadas comparativamente mostrando que essa ferramenta pode ser útil para auxiliar na caracterização de tribos, gêneros, espécies e até mesmo de populações. Rosa et al (2010) demonstrou também a importância da genitália feminina em estudos taxonômicos, por meio de microscopia eletrônica de varredura (ROSA et al., 2010; ROSA et al., 2014; GALVÃO, 2014).

Tais parâmetros já foram adotados para a comprovação de diferenças específicas nos complexos: *Triatoma wygodzinsky* (*T. pseudomaculata* e *T. wygodzinsky*) e *Triatoma sordida* (*T. sordida* e *T. guasayana*) e no estudo de outras espécies do gênero *Triatoma* e dos gêneros *Psammolestes*, *Rhodnius*, *Paratriatoma*, *Eratyrus*, *Cavernicola* e *Panstrongylus*. A genitália masculina segundo Jurberg et al. (1997), constitui um parâmetro importante na diferenciação entre espécies do gênero *Rhodnius*, as peças que contribuem para uma melhor distinção são: o formato do falossoma, o processo mediano do pigóforo (Fig. 7), dos parâmeros e do número de processos da conjuntiva (Neves, 2012).

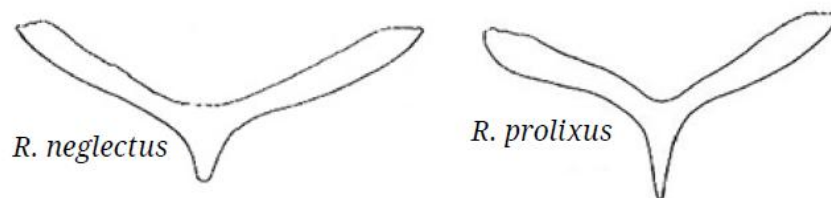


Figura 7. Esquema comparativo do processo mediano do pigóforo das espécies: *R. neglectus* e *R. prolixus* (Modificado de GALVÃO, 2014).

1.4.2 Ovos

A importância do conhecimento dos ovos dos triatomíneos foi ressaltada por Pinto em 1924 ao descrever a morfologia e a coloração dos ovos de *Triatoma brasiliensis*, conseguindo diferenciá-la de outras espécies de barbeiros existentes no Brasil. Segundo Barata (1997), diversos autores vêm se preocupando com o estudo das cascas dos ovos de insetos desde que Galliard em 1935, observou diferenças entre os exocório de diferentes espécies permitindo utilizar esse caractere para distinção entre espécies. Em 1974, Forattini e Barata descreveram

um aspecto morfológico macroscópico importante na diferenciação entre *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*, a existência de uma aglutinação próxima ao opérculo, denominada “colarinho” (Fig. 8). Barata (1981) observando as características do exocório e do opérculo dos ovos, mostrou ser possível a utilização dessas estruturas e ornamentações como caracteres de diferenciação para espécies do gênero *Rhodnius*, tendo então publicado uma chave para identificação que incluiu dez espécies (GALVÃO, 2014).

Recentemente, mais uma ferramenta foi incorporada aos estudos de ovos, a morfometria geométrica, utilizada por Páez-Colasante & Aldana (2008), por análise de imagens provenientes de MEV.

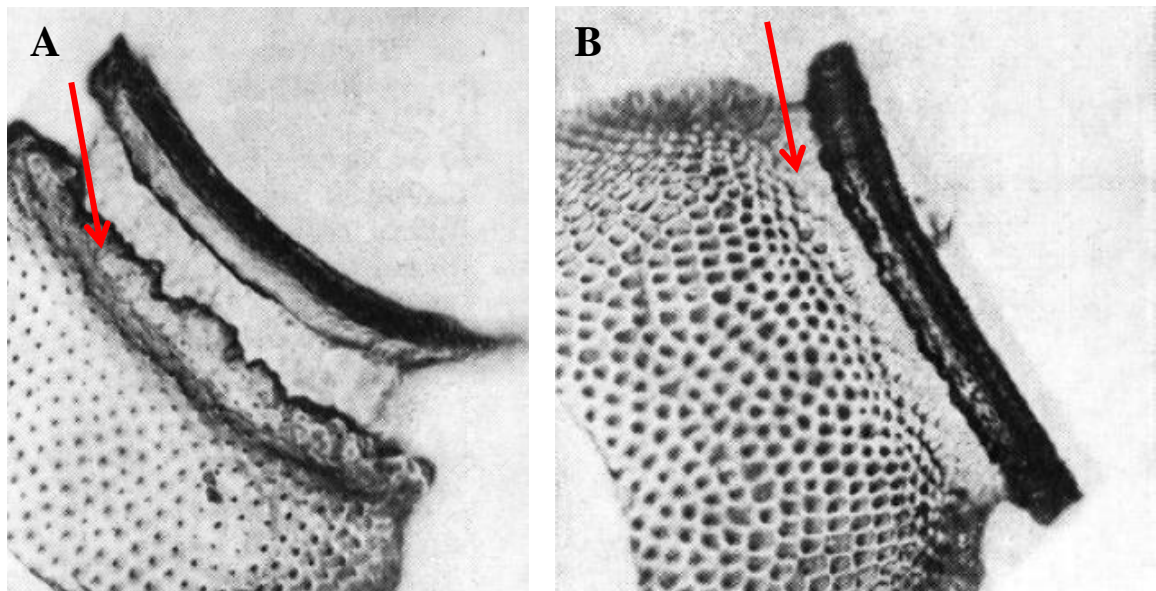


Figura 8. Microfotografia da região pré-opercular de ovos de *R. neglectus* (A) e *R. prolixus* (B) evidenciando a presença ou ausência de “colarinho” (Retirado de Forattini e Barata, 1974).

1.4.3 Ângulo ânterolateral

O pronoto (Fig. 9) dos triatomíneos é extremamente desenvolvido e dividido em dois lobos com diversas estruturas de importância taxonômica, incluindo o ângulo ânterolateral.

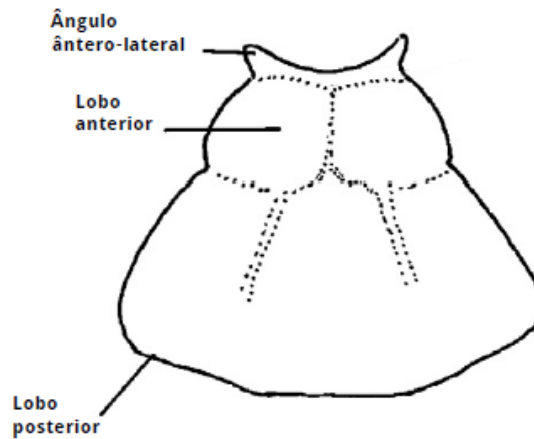


Figura 9. Pronoto, em destaque a estrutura ângulo ânterolateral (Modificado de Galvão, 2014).

Na espécie *R. neglectus* a estrutura se apresenta sendo bem proeminente, já em *R. prolixus* a estrutura possui formato arredondado e não tão proeminente (Fig. 10) (SOTO-VIVAS, 2009; GALVÃO, 2014).

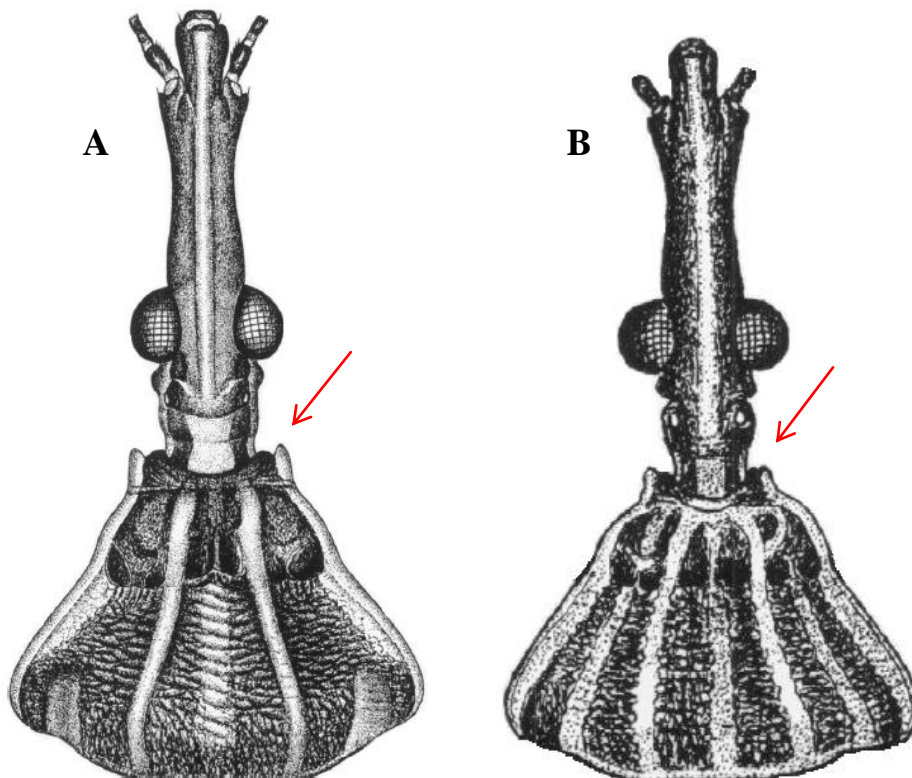


Figura 10. Imagem retratando *Rhodnius neglectus* (A) e *Rhodnius prolixus* (B), com ângulo anterolateral em destaque (LENT E WYGODZYNSKI, 1979).

1.5 Morfometria geométrica

A morfometria geométrica é um conjunto de novas técnicas no estudo da forma de estruturas biológicas em que são utilizados marcos anatômicos (*Landmarks*) ou contornos. As *landmarks* são pontos nos quais as estruturas biológicas são amostradas e que permitem identificar as variações de forma entre as mesmas estruturas morfológicas nos diferentes exemplares em estudo. A sobreposição de *Landmarks*, Análise de Distâncias de Procrustes, quantifica a variação entre formas, é um método em que se comparam formas, definidas pela configuração de *landmarks*, por meio de translação (centra a configuração de *landmarks*), rotação (rotação de todas as configurações de *landmarks* de forma a minimizar as distâncias entre elas) e escalamento (padronização da configuração de *landmarks* a partir do tamanho do centroide) (RODRIGUES & SANTOS, 2003; NEVES, 2012).

1.6 Biologia molecular

Com o desenvolvimento atual de técnicas moleculares é possível a inserção da diferenciação genética de espécies como uma variável a mais para a classificação taxonômica. O uso de marcadores moleculares para fins de análise cladística em Triatominae, auxiliam na resolução de impasses sistemáticos e dúvidas relacionadas à sua filogenia (GARDIM et al., 2013).

Esses estudos utilizam marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial (mtDNA) e no DNA nuclear (nDNA), sendo os marcadores mais utilizados do mtDNA os genes 12S, 16S, citocromo oxidase I (COI), citocromo b (Cytb) e do nDNA os genes ITS1, ITS2, 18S e a porção do domínio 2D do gene 28S. O DNA mitocondrial, herdado maternamente, não sofre recombinação e apresenta uma taxa de evolução de até dez vezes maior que o DNA nuclear, transformando-se numa excelente técnica para a separação de espécies crípticas e estudos de filogenia de triatomíneos (GARDIM, 2010; NEVES, 2012)

A identificação de espécies pertencentes ao gênero *Rhodnius* esteve desde sempre fortemente vinculada a padrões biológicos e morfológicos e às variações de ambos, a identificação de um ponto de vista geral desse gênero pode se valer sem problemas de aspectos morfológicos. Em nível de espécie a identificação, porém, pode ser uma das mais difíceis entre os triatomíneos, especialmente as espécies do complexo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*). Tal dificuldade pode acarretar uma identificação

incorreta e como consequência um prejuízo aos pesquisadores que se baseiam em dados produzidos por trabalhos com espécies erroneamente identificadas, além de prejudicar o conhecimento da distribuição das espécies, por conseguinte dificulta a orientação de ações de combate ao vetor (GURGEL-GONCALVES et al., 2008).

Com o desenvolvimento atual de técnicas moleculares é possível a inserção da diferenciação genética das espécies como uma variável a mais para a classificação taxonômica. Devido ao avanço tecnológico as metodologias morfológicas e morfométricas alcançaram um nível adequado de refinamento e precisão e por isso podem e devem ser utilizadas em complementaridade a outras técnicas.

Neste trabalho, visa-se obter dados, que agregados aos já existentes, poderão proporcionar uma diferenciação mais minuciosa e precisa das espécies englobadas no gênero *Rhodnius*, de modo a contribuir para os estudos taxonômicos e filogenéticos de Triatominae, integrando parâmetros morfológicos, de morfometria geométrica e ferramentas moleculares.

6 CONCLUSÃO

- A partir dos parâmetros utilizados verificou-se que as colônias 58, 63, 67 e 68, não apresentaram os padrões estabelecidos para as espécies em que foram anteriormente classificadas. As demais colônias seguiram os padrões estabelecidos para suas respectivas espécies.

- Apesar do citocromo b ter se mostrado válido na separação das populações de *R. neglectus* e *R. prolixus* mantidas em laboratório, mais um marcador seria de grande valia para dar suporte aos resultados gerados pelo Cytb. No caso do citocromo oxidase I não foi possível sua validação devido a sua não amplificação nas espécies estudadas.

- O aspecto morfológico de presença ou ausência de colarinho nos ovos de diferentes populações de *R. neglectus* e *R. prolixus* foi analisado e mostrou-se útil, porém os resultados passam uma maior segurança quando utilizados em conjunto com outros parâmetros.

- A análise da morfologia da genitália masculina, com ênfase no processo mediano do pigóforo se mostrou útil para distinção de *R. neglectus* e *R. prolixus*, apesar disso não é recomendado sua utilização de maneira isolada e sim juntamente com outros parâmetros, visando uma maior confiabilidade dos resultados.

- A morfometria geométrica de cabeça mostrou-se promissora na separação de populações de *R. neglectus* e *R. prolixus*, mas para uma maior coerência de resultados sugere-se agregar outros parâmetros.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* v 112, p. 159-177. 2009.

ABAD-FRANCH, F. et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 108, supl. 1, p. 92-99, 2013.

ALMEIDA, C.E. et al. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? *Med Vet Entom*, UK (United Kingdom), v. 23, n. 4, p. 410-417, 2009.

ARAS, R et al. Transmissão vetorial da Doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med Trop* v. 36, p. 359-363, 2003.

BARATA, J.M. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II – Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera – Reduviidae). *Rev. Saúde Pública*, v. 15, supl. 5, p. 490-542, 1981.

BARRETT T.V. Current research on Amazonian Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 83, supl. I, p. 441-447. 1988.

BELINATO, M.R.F. Efeito dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em aspectos do fitness de *Rhodnius prolixus*. 2014. 120 f. Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. 2014.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. "*Trypanosoma cruzi*" e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979.

CARCAVALLO, R.U. et al. Atlas dos vetores da Doença de Chagas nas Américas. Organizado por Rodolfo U. Carcavallo, Itamar Galíndez Girón, José Juberg e Herman Lent – Rio de Janeiro: Fiocruz., Vol. II, cap. 12, 393 pág. 1998.

CARCAVALLO R.U. et al. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vec*, v.7, supl. 1, p. 1-99. 2000.

CARVALHO DB et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasion in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. *Acta Trop*. v. 130, p. 35-38. 2014.

CERETTI JUNIOR, W. et al. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. *Rev. Bras. Entomol.*, São Paulo , v. 52, n. 3, 2008 .

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

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. Transfusional transmission control of chagas' disease in the southern cone initiative. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. v. 31, supl.4. 1998.

DIAS J.C.P. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectiva de prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*; v.35, p.669-78. 2002.

DIAS, L. R. Identificação de antígenos salivares imunogênicos de triatomíneos e avaliação de sua eficiência como marcadores de contato para *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae): o papel da apirase salivar. 66 f. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2006.

DUJARDIN J.P. et al. The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop.*, v.66, p. 145–153. 1997

FERREIRA FILHO, J. C. R. et al . Soropositividade para doença de Chagas entre doadores de sangue em Araraquara, Estado de São Paulo, no período de 2004 a 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 44, n. 1, 2011.

FOLMER O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, v.3, p. 294-299. 1994.

FORATTINI, O. P; BARATA, J. M. S. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo , v. 8, n. 4, p. 447-450, dez. 1974 .

FORERO, D. et al. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactocorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, v.70, p.1-12, 2004.

GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, v.202, p.1-36. 2003.

GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series.

GARDIM, S. Relações filogenéticas entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais. 2010. 92f + anexo. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

GARDIM, S. Diagnóstico molecular e relações filogenéticas entre nove espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). 2013. 100 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro , v. 95, n. 4, 2000 .

GONCALVES, T. C. M. et al. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro , v. 108, n. 4, 2013.

GURGEL-GONÇALVES R. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in Central Brazil? *Acta Trop* v.107, p.90-98, 2008.

GURGEL-GONCALVES, R.; CUBA, C. A. C.. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* Lent e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 24, n. 1, 2007.

JURBERG, J. et al. Genitálias dos machos e sua importância na taxonomia. “In: *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas* (R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent eds)”. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997, v. I, p. 85-106.

JURBERG, J. et al. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop*, v.9, supl.1, p. 123-128, 2009.

JURBERG J. et al. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas no Brasil). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2014.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas'disease and implications for human health. *Denisia*, v.19, p.1096-1116. 2006.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Natur Hist*, v.163, p. 123-520, 1979.

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 89-92, Sept. 1999.

LYMAN D.E et al. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, v.60, p. 377-386. 1999.

MENDONÇA, V. J. Estrutura genética de três membros do complexo *Triatoma brasiliensis* que ocorre no Estado da Bahia, com enfoque principal para *Triatoma sherlocki* Papa et al. 2002 (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). 2011. Tese (doutorado). Universidade de Campinas, 2011.

MENDONÇA, V. J. et al. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa*, v. 4107, n. 2, p. 239–254, 2016.

MONTEIRO F.A. et al. 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. et al. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* v.12, p. 997-1006, 2003.

NEVES S.C.T. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil. 2012, *Instituto Oswaldo Cruz*, <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/6922>

OLIVEIRA, J. Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2015.

PÁEZ-COLASANTE X.; ALDANA, E. Morfometría geométrica del borde corial y del collar de huevos de cinco especies del género *Rhodnius* Stal (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomo Brasiliis*, v.1, p. 57-61. 2008.

RODRIGUES, L.A.; SANTOS, V.F. Morfometria geométrica - aplicações em paleobiologia de Dinossáurios. *Ciências da Terra (UNL)*, v.5, p. 141-145. 2003.

RODRIGUES, V.L.C.C. et al. Detecção de triatomíneos da espécie *Rhodnius neglectus* em área urbana de municípios da região de Araçatuba. *Bepa Bol. epidemiol. paul. (Online)*, São Paulo, v. 6, n 63, Março 2009.

RODRIGUES, V.L.C.C. et al . Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, São Paulo*, v. 56, n. 3, p. 213-218, 2014.

ROSA, J. A. et al. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, 2010.

ROSA J. A. et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n.sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*. v. 3478, p.62-76. 2012.

SANTOS, C. M. et al. Comparative descriptions of eggs from three species of *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, 2009.

SANTOS, R.V.; COIMBRA J.R., C.E.A.,orgs. *Saúde e povos indígenas* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 251 p. ISBN 987-85-7541-277-(). Available from ScieELO Books [HTTP://books.scielo.org](http://books.scielo.org)

SCHOFIELD, C. J. Triatominae Biology & Control. West Sussex: Eurocommunica Publications, 1994.

SILVEIRA, A.C. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 2, p. S35-S42, Jan. 2000.

SOARES, R.P. et al. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.62, p. 157-161, 2000.

SOARES, R.P.P. et al. . Characterization of *Rhodnius neglectus* from Two Regions of Brazil Using Isoenzymes, Genitalia Morphology and Morphometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 161-166, 1999.

SOTO-VIVAS A. Clave pictórica de triatóminos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. *Bol Mal Salud Amb*, v.49, supl. 2, p. 259-74. 2009.

WHO, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso as 23h00 no dia 12 de Fevereiro de 2016.

WESTPHALEN, E.V.N.; BISUGO, M.C.; ARAUJO, M.F.L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *BEPA, Bol. Epidemiol. (Online)*, São Paulo, v. 9, n. 105, set. 2012.

YEO M. et al. Origins of Chagas disease. *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Parasitology*, v.35, p. 225-233. 2005.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, 2009.