



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara



“Estudo de transcriptomas por RNAseq em tecidos de cabeça e glândula salivar de *Rhodnius montenegrensis* e *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).”

Danila Blanco de Carvalho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Araraquara – SP

2016

Ficha Catalográfica

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

C331e Carvalho, Danila Blanco de
Estudo de transcriptomas por RNAseq em tecidos de cabeça e glândula salivar de *Rhodnius montenegrensis* e *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Danila Blanco de Carvalho – Araraquara, 2016
81 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: João Aristeu da Rosa

Co-orientador: Reinaldo Alves de Brito

1. Doença de Chagas. 2. Triatominae. 3. *Rhodnius*. 4. Diferenciação específica. 5. Diferenciação molecular. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Brito, Reinaldo Alves de, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Araraquara-SP, com apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por meio da concessão de bolsa de Doutorado vinculada ao projeto "Estudo Biológico e taxionômico de vetores Trypanosomatidae" - AUXPE - Parasitologia - 1528/2011 processo nº 23038.005285/2011-12 (Processo 2009/52236-2).

Dedicatória

Ao meu filho, Dante, que chegou alegrando e completando nossas vidas; ao meu marido, Rafael, pelo apoio, companheirismo, compreensão e paciência; aos meus pais, Jerônimo e Maria Eugênia, pelo carinho e confiança e à minha avó Maria da Conceição que sempre acreditou nos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, meu orientador, por todo apoio, amizade incentivo e confiança, desde a graduação, fundamentais para meu crescimento científico, profissional e pessoal! Obrigada!

Ao Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito, pela co-orientação, parceria e por gentilmente ter me recebido em seu Laboratório e cedido seu tempo, estrutura e pessoal para o desenvolvimento deste estudo!

Ao programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, que possibilitou a execução deste estudo!

À CAPES, pela bolsa e auxílio projeto "Estudo Biológico e taxionômico de vetores Trypanosomatidae" - AUXPE - Parasitologia - 1528/2011 processo nº 23038.005285/2011-12 (Processo 2009/52236-2).

Ao Prof. Dr. Daniel Frías Lasserre, pela recepção, gentileza e trabalho em seu laboratório durante meu estágio sanduíche na Universidad Metropolitana de la Ciencia de la Educación em SantiaGO, Chile!

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia da FCF e do laboratório de Genética de Populações da UFSCAr, pela amizade, apoio, incentivo e convivência, que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho!

À Dra. Samira Chahad Ehlers pelas aulas de dissecação, auxílio, sugestões, confiança e amizade que foram importantes em todas as etapas para que este trabalho fosse desenvolvido!

Ao Dr. Carlos Congrains, pela amizade e por prontamente ter me auxiliado nas etapas de bioinformática fundamentais deste trabalho!

À amiga Heloísa Pinotti, pelo auxílio em muitas etapas do trabalho, inclusive como motorista no final da gestação do Dante!

Ao amigo Jader de Oliveira, pela amizade e auxílio na identificação morfológica das espécies do trabalho e também com os diversos tipos de inseto!

Às funcionárias Cláudia Lúcia Molina, Daniela Altieri Tita Lockermann Oliveira, Joyce Conceição G. Romero e Flavia Sousa De Jesus da Seção de Pós-Graduação, pela amizade, gentileza e pronto atendimento!

A todos os funcionários da FCF que direta, ou indiretamente contribuíram para minha estadia.

Aos meus pais pelo apoio e confiança sempre depositados!

Ao meu marido, Rafael, pela força e paciência durante todos esses anos!

Ao meu filho, Dante, que veio alegrar nossas vidas.

Aos meus amigos e demais familiares pela paciência, compreensão!

E, principalmente a Deus, pela saúde e força durante todos os momentos da minha vida!

A todos, muito obrigada!

“Só entende o que encontra, quem sabe o que procura.”

Prof. Antônio Carlos Pizolitto

Lista de Siglas e Abreviaturas

DCA: doença de Chagas aguda

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Rm: *Rhodnius montenegrensis*

Rr: *Rhodnius robustus*

SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único

GO: *Gene Ontology*

Lista de Figuras

Figura 1	Fêmea de <i>R. montenegrensis</i> . A. dorsal; B. ventral	36
Figura 2	Fêmea de <i>R. robustus</i> . A. dorsal; B. ventral	37
Figura 3	Termos do <i>Gene Ontology</i> encontrados para as regiões codificantes de <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i>	48
Figura 4	Valor absoluto da diferença de frequências (D) dos alelos em 13.696 <i>SNPs</i> compartilhados entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i>	49
Figura 5	Diferença média de frequência dos alelos dos transcritos (\bar{D}) entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i>	50
Figura 6	Distribuição de <i>SNPs</i> por <i>contig</i>	50

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resumo estatístico das montagens de tecido de cabeça e glândula salivar de <i>R. montenegrensis</i> (Rm) e <i>R. robustus</i> (Rr)	46
Tabela 2	Anotação pelo programa Blastx dos <i>contigs</i> com 100% de diferença após o enriquecimento com o <i>TopGO</i>	51
Tabela 3	Anotação e função dos 7 <i>contigs</i> sabidamente importantes com Ka/Ks maior que 1	52

Glossário

Contig: conjunto de *reads* formados após a montagem, seriam os “genes”.

\bar{D} : média de D para os SNPs de um determinado transcrito.

D: diferença entre as frequências alélicas de um SNP da variante *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

Kmer: fragmentos gerados pelo programa de montagem *Trinity* para reorganizá-los em *contigs*.

N50: metade da soma dos comprimentos de todos *contigs*. O número de bases de todas os *contigs* mais curtos do que o N50 estará perto do número de bases de todos *contigs* mais longos do que o N50.

Pair –end reads: o programa gera sempre um par de *read*.

Read: são as sequências de leitura feitas pelo sequenciador.

SNP : Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

SNP calling: procurar esses polimorfismos entre os alelos, feito pelo programa *VarScan 2*.

SUMÁRIO

	Lista de Abreviaturas e Siglas	08
	Lista de Figuras	09
	Lista de Tabelas	10
	Glossário	11
	Capítulo I	15
1.	Resumo	16
2.	Abstract	18
3.	Introdução	20
	3.1. Situação da doença de Chagas no Brasil e no Mundo	21
	3.2. Triatomíneos e Distribuição espacial no Brasil	24
	3.3. Espécies do gênero <i>Rhodnius</i>	28
	3.4. Processo de especiação	29
	3.5. Sequenciamento de Próxima geração	32
4.	Objetivos	35
	4.1. Caracterização de transcriptoma de tecidos de cabeça e glândulas salivares de <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	35
	4.2. Buscar diferenças que possam auxiliar no entendimento do processo de diferenciação, bem como para a identificação específica de <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	35

5.	Material e Métodos	35
5.1.	Exemplares	35
5.2.	Dissecação dos insetos	37
5.3.	Extração do RNA total	38
5.4.	Purificação do RNA	39
5.5.	Sequenciamento em Hi-seq 2500 Illumina	39
5.6.	Análise de bioinformática	39
5.6.1.	Filtragem e montagem das sequências – SeqyClean e Trinity	40
5.6.2.	Alinhamento das Sequências - Bowtie2	41
5.6.3.	Busca de Variantes - VarScan2	42
5.6.4.	Predição de regiões codificantes (CDS)	42
5.6.5.	Avaliação da qualidade da montagem e anotação do transcriptoma por BUSCO	43
5.6.6.	Anotação funcional	43
5.6.7.	Teste de seleção Ka/Ks	44
6.	Resultados	45
6.1.	<i>De novo</i> transcriptome assembly	45
6.2.	Regiões codificantes (CDS) e anotação funcional	46

6.3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs) encontrado	49
6.4. Anotação funcional dos <i>contigs</i> $\bar{D} = 100\%$	51
6.5. Teste de seleção Ka/Ks	51
7. Discussão	52
8. Conclusão	58
9. Desafios encontrados no decorrer do estudo	58
10. Referências bibliográficas	59
Capítulo II	66

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

Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy.

CAPÍTULO I

1. Resumo

CARVALHO, Danila Blanco. “**Estudo de transcriptomas por RNAseq em tecidos de cabeça e glândula salivar de *Rhodnius montenegrensis* e *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**”. Defesa (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP.

A doença de Chagas é uma das principais parasitoses que ocorrem na América Latina, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é veiculado por triatomíneos. Estima-se que entre oito milhões de pessoas estejam infectadas. *Rhodnius* é um dos gêneros que pode veicular *T. cruzi* e inclui espécies estreitamente relacionadas com baixos níveis de diferenciação morfológica. Atualmente, existem 19 espécies conhecidas, entre elas, *Rhodnius montenegrensis* que é considerada a fim de *Rhodnius robustus*. Para investigar as diferenças genéticas interespecíficas dessas duas espécies utilizou-se a metodologia de larga escala RNA-seq. Por essa técnica foram geradas quatro bibliotecas de RNA total de cabeças e glândulas salivares de machos de *R. montenegrensis* e *R. robustus*. Após filtrar pela qualidade, foram realizadas montagens *de novo* de cada uma das espécies. Esse processo resultou em 64952 *contigs* para *R. montenegrensis* e 70894 para *R. robustus* com N50 de 2100 para as duas espécies aproximadamente. Com base na montagem de *R. robustus*, foi feita uma procura por *SNPs* e foram encontrados 3055 polimorfismos interespecíficos fixados. Foram selecionados 216 transcritos com alta divergência contendo apenas polimorfismos fixados entre as duas espécies. O teste de enriquecimento nesses transcritos revelou uma sobrerepresentação de oito termos relacionados ao complexo da proteína clatrina. Os resultados obtidos mostram que *R. montenegrensis* e *R. robustus* apresentam uma quantidade substancial de polimorfismos interespecíficos fixados o que sugere um alto grau de divergência genética entre as duas espécies.

Palavras chaves: Doença de Chagas, Triatominae, *Rhodnius*, diferenciação específica, diferenciação molecular.

2. Abstract

CARVALHO, Danila Blanco. "Transcriptome study by RNA Seq in tissues of head and salivary gland of *Rhodnius montenegrensis* and *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)."

Chagas disease is one of the main parasitic diseases found in Latin America infecting an estimated eight million people worldwide. The protozoan *Trypanosoma cruzi*, its etiological agent, uses triatomines as a disease vector, among them the genus *Rhodnius*. This genus includes species that have been difficult to differentiate because they show low amounts of morphological differentiation. Despite that, there are currently 19 known species described, one of them *Rhodnius montenegrensis*, which has been confounded with *Rhodnius robustus*. Here we generated Large-scale RNA-sequencing data from heads and salivary glands to investigate genetic differences between these two species. We produced a total of four RNAseq libraries from heads and salivary glands of males of *R. montenegrensis* and *R. robustus*. *de novo* transcriptome assemblies produced for each species resulted in 64,952 *contigs* for *R. montenegrensis* and 70,894 *contigs* for *R. robustus*, with N50 of approximately 2100 for both species. We performed a search for *SNPs* based on the more complete *R. robustus* assembly and found 3,055 fixed interspecific differences. We identified two hundred and sixteen transcripts with high levels of divergence which contained fixed polymorphisms found between the two species. A *Gene Ontology* enrichment analysis revealed that these highly differentiated transcripts were enriched for the following terms: clathrin coat of endocytic vesicle, AP-2 adaptor complex, clathrin-coated endocytic vesicle, clathrin-coated endocytic vesicle membrane, clathrin coat of coated pit, endocytic vesicle membrane, clathrin vesicle coat, and coated pit. The results reveal that

R. montenegrensis and *R. robustus* show a substantial quantity of fixed interspecific polymorphisms, a finding which suggests a high degree of genetic divergence between the two species, which likely corroborates their species status.

Key words: Chagas disease, Triatomine, *Rhodnius*, specific differentiation, molecular differentiation.

3. Introdução

Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas descreveu o protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da tripanossomíase americana, assim como toda a cadeia epidemiológica dessa zoonose: (i) o vetor, *Panstrongylus megistus*, à época denominado *Conorhinus megistus*, (ii) animais que foram infectados (cobaia, cão, coelho, macaco) e (iii) a infecção humana, que tem Berenice como a primeira pessoa encontrada infectada. O renomado cientista também conseguiu cultivar *T. cruzi* em meio de cultura artificial, ágar sangue, preparado segundo Novy e Mac Neal e detectou as diferenças de comportamento em animais de laboratório dos diferentes isolados do protozoário (CHAGAS, 1909).

O ciclo de vida de *T. cruzi* inclui diferentes formas no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são encontradas no vetor, sendo as primeiras caracterizadas pelo formato alongado, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior. Já as tripomastigotas metacíclicas são alongadas, com cinetoplasto posterior ao núcleo, com flagelo que se estende por toda a célula e torna-se livre na porção anterior. As formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares são encontradas no vertebrado, sendo a amastigota arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. A transição entre uma forma e outra envolve modificações morfológicas, na expressão gênica e no ciclo celular (CARREA; DIAMBRA, 2016).

As manifestações clínicas são bastante variáveis e apresentam duas fases: aguda e crônica. A primeira é geralmente assintomática, já a fase crônica pode ser assintomática ou clinicamente evidente após anos ou décadas da

infecção inicial, sendo as manifestações mais comuns o comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico (ANDRADE *et al.*, 2015).

3.1. Situação da doença de Chagas no Brasil e no Mundo

Os meios pelos quais o homem pode tornar-se infectado podem ser pela transfusão sanguínea, por via congênita, aleitamento materno, por via oral, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos e por meio das fezes dos triatomíneos que, desde a descrição da doença por Chagas, é o mecanismo mais prevalente (RASSI E MARIN-NETO, 2010).

Na América Latina, essa zoonose tem grande importância por sua mortalidade e a Organização Mundial de Saúde estima que, aproximadamente, seis e sete milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo e 28.000 casos por ano nos 21 países dessa região (WHO, 2015). Acredita-se que a infecção humana por *T. cruzi* em países não endêmicos acontece devido à emigração e a falta de triagem em bancos de doação de sangue. Esse fato é observado em países como os Estados Unidos onde se acredita que cerca de 300.000 pessoas chagásicas estejam vivendo, países da Europa 80.000, no Canadá 5.500, no Japão 3.000 e na Austrália 1.500 (COURA, VIÑAS, 2010).

Os movimentos migratórios ajudaram a disseminar *T. cruzi* para regiões não endêmicas, o que obriga a aplicação de medidas mais rígidas de controle e vigilância da doença de Chagas nos países de origem e de destino (COURA, VIÑAS, 2010). A Espanha, por exemplo, já incluiu exames para detectar a doença em gestantes latino-americanas, assim como a triagem em

bancos de sangue e transplantes (PEREZ-MOLINA *et al.*, 2011; BARONA-VILAR *et al.*, 2012).

No Brasil, os casos de doença de Chagas humana estão distribuídos em uma área de três milhões de quilômetros quadrados sendo encontrada, principalmente, nos Estados do Rio Grande do Sul, parte de Santa Catarina e região noroeste do Paraná, Minas Gerais (exceto o Sul), São Paulo, GOiás e Estados do Nordeste. Na Região Amazônica há focos de transmissão natural no Pará, no Amapá e no Alto Rio Negro .

Com a urbanização e migração da população rural a partir da década de 1940, foi introduzido novo risco de transmissão da doença de Chagas: transfusão sanguínea (DIAS, SCHOFIELD, 1998). Estima-se que ocorreram cerca de 6.000 a 10.000 casos de doença de Chagas transmitidos por transfusão sanguínea em 1960 nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo (COURA, VIÑAS, 2010).

Após a década de 1980, quando aumentou o controle sorológico das bolsas de sangue devido ao advento da AIDS (DIAS, SCHOFIELD, 1998; DIAS, SILVEIRA, SCHOFIELD, 2002), diminuiu muito essa via de transmissão (COURA, VIÑAS, 2010). Atualmente, com o grande aumento da imigração de populações de regiões endêmicas, a transmissão transfusional ganha destaque nos países não endêmicos para doença de Chagas, ocasionando um novo quadro para saúde pública desses países (SCHMUNIS, 2007). Como já citado, os países que recebem muitos imigrantes de regiões endêmicas já estão tomando medidas para controle da doença (PEREZ-MOLINA *et al.*, 2011; BARONA-VILAR *et al.*, 2012).

Desde a criação da Iniciativa Cone Sul, em 1991, objetivou-se o combate do principal vetor *Triatoma infestans*, além da redução do risco de transmissão por transfusão sanguínea (VINHAES, DIAS, 2000), a incidência de doença de Chagas decresceu drasticamente e, o mais importante, foi o efetivo controle de sua transmissão natural em âmbito nacional (DIAS *et al.*, 2000).

A transmissão por via oral, uma das formas de transmissão mais relatadas nos últimos anos, ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* provenientes das fezes de triatomíneos infectados (LEWINSOHN, 2005). A grande maioria dos casos estudados são episódios súbitos e inesperados, ocorrendo em pequenos e limitados surtos (DIAS, 2006). Embora acidental, essa forma de transmissão já é considerada endêmica na região Amazônica (JUNQUEIRA, DEGRAVE, BRANDÃO, 2005). O primeiro surto de transmissão oral relatado no Brasil aconteceu em Teutônia (Estrela, RS) em 1968 (NERY-GUIMARÃES *et al.* 1968), foram 18 pessoas infectadas e seis morreram. Em outubro de 1986, em Catolé do Rocha - PB (SHIKANAI-YASSUDA *et al.*, 1991), 26 pessoas se contaminaram provavelmente após o consumo de sumo de cana-de-açúcar e uma faleceu. Este foi semelhante ao que ocorreu em Navegantes, Estado de Santa Catarina, em março de 2005, com três mortes. Nessa ocasião, a mesma linhagem de *T. cruzi* foi isolada do sangue dos pacientes infectados, do vetor *Triatoma tibiamaculata* e dos hospedeiros silvestres, gambás das espécies *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*, presentes na mata próxima ao local da infecção (STEINDEL *et al.*, 2008). Em 2006, 430 pessoas adquiriram a doença após ingerirem açaí em determinados pontos de venda no estado do Pará, nesse episódio, pesquisadores mostraram que *T. cruzi* é capaz de sobreviver na polpa da fruta

tanto em temperatura ambiente, como a 4°C, temperatura média de uma geladeira, e até a -20°C, no açaí congelado (NÓBREGA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2012). Vários outros focos isolados da doença têm sido observados no Brasil, sem grande repercussão. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2014), o Estado brasileiro com o maior número de casos de doença de Chagas aguda é o Pará, com mais de 110 notificações por ano. Nesse Estado ocorre alto índice de infecção oral devido aos hábitos alimentares da população e a deficiência no processo de higienização no preparo e no armazenamento desses alimentos (NÓBREGA *et al.*, 2009).

3.2. Triatomíneos e Distribuição no Brasil

Os vetores da doença de Chagas pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, que compreende insetos facilmente reconhecíveis por apresentarem um par de asas tipo hemiélitros e aparelho bucal picador-sugador (LENT, WYGODZINSKY, 1979).

Os triatomíneos são vulgarmente conhecidos como barbeiros, vinchucas, chirimachas, chupões, procotós, e muitos outros nomes. Esses insetos são classificados como pertencentes à família Reduviidae, que agrupa, em sua maioria, percevejos predadores distribuídos por várias subfamílias. Segundo Lent e WyGODzinsky (1979), todos os triatomíneos são hematófagos obrigatórios durante todos os estádios ninfais e adulto, mostrando indícios de uma estreita co-evolução com vertebrados. A hematofagia obrigatória resultou de uma modificação evolutiva a partir de uma hematofagia facultativa em ancestrais predadores que habitaram ninhos de animais (SCHOFIELD e DIAS,

1999), no entanto, não se conhece precisamente estes táxons e tal questão é dificultada por só existirem 2 registros fósseis (GALVÃO *et al.*, 2003).

Além disso, devido a essa hematofagia, todas as espécies são potencialmente transmissoras de *T. cruzi*, embora algumas sejam mais capacitadas em transmitir o parasito ao homem, como *T. infestans*, pois tem excelente adaptação às casas. Nesse sentido, possuem maior significância epidemiológica as espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009).

Desde a descrição da doença por Carlos Chagas, várias espécies de triatomíneos tornaram-se conhecidas, com maior ou menor importância na transmissão domiciliar da infecção. O que determina essa capacidade é sua adaptação ao domicílio. Para o sucesso dessa adaptação é preciso que existam fontes alimentares peri-domésticas e, fundamentalmente, que o vetor possua alta antropofilia, ao colonizar ou não o interior da habitação (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2012).

Importante lembrar que a transmissão domiciliar da doença de Chagas é própria de espaços abertos, naturais ou produto da ação antrópica. Portanto, a intervenção do homem sobre o ambiente promove o deslocamento dos triatomíneos de seus ecótopos silvestres, levando-os às moradias humanas, muitas vezes mal construídas, e em seu entorno peri-domiciliar, condições ideais de abrigo e sobrevivência (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2012).

Além da alteração ambiental, a capacidade vetorial das diferentes espécies de vetor depende de características intrínsecas a cada espécie, tais como: maior grau de antropofilia e metaciclogênese (produção de um maior número de formas infectantes de *T. cruzi*) e de menor tempo entre repasto

sanguíneo e dejeção (DA SILVA, LUQUETTI e DA SILVA, 1993). São cerca de 150 as espécies descritas de triatomíneos e, no Brasil, 65 espécies atualmente descritas (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2012; WHO, 2015). Dessas, as que têm, ou tiveram, participação mais relevante na transmissão domiciliar da doença de Chagas são: *T. infestans*, *Panstrongilus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*; *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. neglectus* (SILVEIRA e REZENDE, 1994).

É sabido hoje que o Estado do Pará é recordista em casos de doença de Chagas Aguda (DCA) no país (SINAN, 2014). A transmissão está indiretamente ligada aos triatomíneos, em especial às espécies do gênero *Rhodnius*. O que promove esse alto número de DCA é principalmente o consumo de alimento infectado por *T. cruzi*, com fezes de triatomíneos contaminados como o açaí, por exemplo. A contaminação se deve pela falta de higiene no processamento desse alimento que pode conter fezes de triatomíneo, tornando-o susceptível à transmissão do *T. cruzi* (NÓBREGA *et al.*, 2009).

Outro lado importante na situação atual da doença de Chagas é que mesmo que a maioria das espécies do gênero *Rhodnius* fosse considerada silvestre já se conhece algumas que colonizam moradias rurais, como *R. prolixus* (ABAD-FRANCH *et al.*, 2009).

Outras espécies desse gênero importantes na transmissão do agente causador da tripanossomíase americana e também capazes de invadir e colonizar esporadicamente ambientes humanos são *R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, *R. neglectus*, *R. nasutus* e *R. stali*. Na região Amazônica é comum o relato de invasões acidentais ao ambiente humano de *R. robustus*, *R. pictipes* e *R. brethesi* e, assim, favorecem a contaminação de alimentos e/ou utensílios

utilizados no seu processamento. Esse seria um fator de grande importância epidemiológica devido ao grande aumento de casos de DCA na região. Outro fato que favorece o contágio dessa enfermidade é a invasão humana ao ambiente silvestre, como ocorre com os trabalhadores rurais e extrativistas na região de Floresta (COURA *et al.*, 2002; AGUILAR *et al.*, 2007).

Por outro ponto de vista, os relatos de invasão em moradias humanas por triatomíneos, especialmente de espécies do gênero *Rhodnius*, não se restringem mais a ambientes silvestres ou rurais. *R. neglectus* tem chamado atenção da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN do Estado de São Paulo, por ser encontrado em centros urbanos, principalmente habitando palmeiras que ornamentam praças das cidades, e levando o risco às populações urbanas. De acordo com o órgão, essa é a terceira espécie mais coletada no Estado de São Paulo (SILVA *et al.* 2011). Estudos ento-epidemiológicos, coletaram *R. neglectus* entre 2004 e 2011 no noroeste do Estado de São Paulo (SILISTINO-SOUZA *et al.*, 2013) e 2004 a 2008 no noroeste desse Estado (ALEVI, RODAS, *et al.*, 2015) isso demonstra que o risco de transmissão na região não está extinto.

Após notificação da população, uma pesquisa realizada por técnicos da SUCEN encontrou uma infestação de *Rhodnius neglectus* em palmeiras da área urbana do município de Araçatuba-SP e pouco tempo depois foi notificada a invasão desses vetores em apartamentos de edifícios próximos às palmeiras infestadas (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Em fevereiro de 2012 a Vigilância Sanitária e Epidemiológica do município de Monte Alto - SP foi notificada pela população local sobre invasões domiciliares noturnas por possíveis vetores da doença de Chagas no centro urbano da cidade. Após uma investigação nas palmeiras da praça central encontrou-se

colônias de *R. neglectus* em seus diferentes estádios ninfais, incluindo ovos o que demonstra a instalação desses vetores no ambiente urbano. Nesta ocasião a SUCEN não encontrou contaminação por *T. cruzi*, porém a colonização desse vetor no ambiente urbano requer vigilância contínua e instala a possibilidade de endemia chagásica (CARVALHO *et al.*, 2013).

3.3. Espécies do gênero *Rhodnius*

A tribo Rhodniini é constituída de dois gêneros: *Psammolestes* (três espécies) e *Rhodnius* (19 espécies) que ocorrem naturalmente na Região Neotropical das Américas (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2007). Assim como todas espécies de Triatominae, são insetos hematófagos obrigatórios em todas as fases do ciclo de vida. Um detalhe importante dessa tribo é que se trata de espécies arborícolas e o habitat da maioria das espécies de *Rhodnius* está associada a copa de palmeiras e as espécies de *Psammolestes* são encontradas em ninhos de aves. Devido a esse habitat, a maioria das espécies é considerada silvestre (LENT e WYGODZINSKY, 1979; ABAD-FRANCH *et al.*, 2009).

No ato da postura as fêmeas de *Rhodnius* liberam uma substância adesiva, assim, os ovos ficam aderidos ao substrato, o que favorece sua dispersão passiva e ativa, pois muitas aves formam ninhos em palmeiras e têm hábitos migratórios. Além disso, esse gênero possui um ciclo de vida relativamente rápido e isso facilita a formação de novas colônias nesses ambientes (ABAD-FRANCH *et al.*, 2009).

Uma característica particular do gênero *Rhodnius* é a dificuldade quanto à identificação dentre as espécies que o compõem se for utilizada apenas a morfologia de estruturas tradicionalmente analisadas por microscopia de luz

(NEIVA e PINTO, 1923; LENT e WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO *et al.*, 2003). Pesquisadores demonstraram por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que a genitália feminina é uma importante ferramenta para a identificação das espécies, tanto pela MEV, quanto por microscopia de luz (ROSA *et al.*, 2014).

Por outro lado, as técnicas moleculares também podem auxiliar em estudos de identificação de espécies, uma vez que sequências de aminoácidos e de nucleotídeos apresentam um número elevado de caracteres que se diferenciaram durante o processo de evolução e a análise dessas diferenças entre organismos auxilia na reconstrução filogenética e ajuda na diferenciação de espécies crípticas (FUTUYMA, 1995). Vários marcadores moleculares podem ser explorados para fornecer informações sobre a variabilidade genética dos triatomíneos por meio da detecção de polimorfismo de DNA (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Rosa et al (2012) ao descreverem o *R. montenegrensis*, utilizaram ferramentas de microscopia tradicional, morfometria e MEV, em conjunto com sequenciamento de porção da região do citocromo b mitocondrial, demonstraram, além da descrição dessa nova espécie, a importância de complementaridade entre as diferentes técnicas para favorecer a diagnose específica, assim como para a identificação.

3.4. Processo de especiação

Alguns autores consideram a especiação como sendo o processo evolutivo de formação de novas espécies ocasionado pelo acúmulo de diferenças genéticas até surgir uma barreira contra o fluxo gênico e,

conseqüentemente, o isolamento reprodutivo (BUTLIN e RITCHIE, 2001; WU e TING, 2004).

Devido ao isolamento reprodutivo, as espécies deixam de compartilhar material genético e, portanto, passam a acumular diferenças genéticas por deriva genética e por seleção natural. Com o aumento no tempo de divergência entre as espécies, as diferenças se acentuam, dificultando a distinção dos genes responsáveis pelo isolamento reprodutivo daqueles que se diferenciaram após divergência inicial (PAPADOPULOS *et al.*, 2014).

A especiação simpátrica ocorre quando as populações não estão isoladas geograficamente isso favorece que o fluxo gênico continue ocorrendo e aumenta a complexidade do processo. Nesses casos, a diferenciação populacional e a especiação ocorrem por pressões ambientais e comportamentais e a consequência dessas forças é a limitação do fluxo gênico (PAPADOPULOS *et al.*, 2014).

Em processos de especiação, é comum pensar que ocorre em populações que passam por isolamento geográfico. É lógico que a tendência de indivíduos de duas populações geograficamente separadas se reproduzirem entre si é consideravelmente menor. Esse isolamento é comprovado com o aumento da diferença genética de acordo com o aumento da distância entre as populações. Por outro lado, na especiação ecológica, as influências para o isolamento reprodutivo podem ocorrer por diferenças ambientais e ecológicas entre as populações. Essas diferenças podem favorecer o surgimento de híbridos entre tais populações que possuam indivíduos e alelos mal adaptados e conseqüentemente reduzir o fluxo gênico (PAPADOPULOS *et al.*, 2014). Portanto esse processo pode levar a uma especiação. Ainda pode ocorrer uma

seleção de híbridos e esta pode ser semelhante ao que ocorre no isolamento geográfico já que o aumento das diferenças entre os indivíduos pode ter como consequência o isolamento sexual e, portanto reprodutivo (PAPADOPULOS *et al.*, 2014). Desta forma, conclui-se que processos ecológicos são fundamentais para a formação de novas espécies, pois agem na evolução das barreiras ao fluxo gênico (isolamento reprodutivo) entre populações (RUNDLE e NOSIL, 2005).

Durante a especiação, regiões do genoma sob seleção positiva também vão se diferenciar mais rápido do que as demais e havendo fluxo gênico essas diferenças serão reforçadas (FEDER, EGAN e NOSIL, 2012). Segundo a teoria de “ilhas genômicas” essas regiões influenciariam outras regiões do genoma permitindo outros alelos, mais fracamente selecionados, se acumularem e formarem blocos de alelos selecionados. Esse acúmulo crescente pode levar a especiação e é, provavelmente, o que ocorre na especiação simpátrica (FEDER e NOSIL, 2010; NADEAU *et al.*, 2012).

O processo de especiação dentro do Triatominae ainda não é bem compreendido. Pesquisadores acreditam que a seleção natural pode desempenhar um papel importante na especiação, de modo que muitas espécies se adaptaram a habitats muito específicos. Como ocorre com *Cavernicola pilosa*, que só é encontrado em cavernas de morcegos, e as espécies de *Psammolestes* que são associados aos ninhos. Em contraste, existem muitos grupos de espécies silvestres que permanecem generalistas, tais como *Triatoma sordida* que pode ser encontrada numa grande variedade de habitats. Em certa medida, as espécies podem ser classificados de acordo com seu grau de adaptação a habitats mais estáveis, como o ambiente doméstico, e pode ser que

as espécies mais generalistas representam aqueles que ainda têm o potencial para uma maior adaptação a habitats mais específicas (SCHOFIELD, C.J.,2000)

A dificuldade de entendimento do processo de especiação para *Rhodnius* é consequência da dificuldade de distinção entre as espécies do gênero. Na descrição do *R. montenegrensis*, Rosa e colaboradores (2012) demonstraram a distinção com *R. robustus* utilizando diversas metodologias, no entanto a distância genética segundo o citocromo b mitocondrial foi baixa. Isso ocorre com esses marcadores mitocondriais em caso de espécies muito próximas evolutivamente, devido ao fato de não ter havido tempo evolutivo suficiente para uma melhor diferenciação do DNA mitocondrial. Assim, a identificação de genes com alta taxa evolutiva, ou que estejam relacionados diretamente ao processo de especiação facilitará o estudo das diferenças genéticas de espécies irmãs ou proximamente relacionadas (ZENG *et al.*, 2000).

3.5. Sequenciamento de Próxima geração

Há pouco tempo, estudos evolutivos utilizavam poucos marcadores para responder às questões de diferenciação entre as espécies. Esses marcadores eram geralmente sequências de DNA específicas sequenciadas em Sanger que, em muitos casos, não conseguiam responder às questões levantadas, além de demandar um longo tempo de sequenciamento e um custo mais elevado. Desde 2005, para viabilização do genoma humano, (lançado o *Roche 454 System*, seguido por outros sequenciadores tais como o *SOLiD* da Applied Biosystems e o *HiSeq2000* da Illumina). Depois de grande aperfeiçoamento, esses três sistemas apresentam ótimos desempenho e muitas

vantagens em termos de comprimento de leitura, precisão, aplicações e custo operacional (LIU *et al.*, 2012).

A capacidade de gerar muitos dados em pouco tempo e a um custo inferior ao das antigas técnicas tem auxiliado na elucidação de questões em diversas áreas biológicas como genética de populações, filogeografia, filogenia e ecologia molecular (BOKULICH *et al.*, 2012; BRAS, GUERREIRO e HARDY, 2012), também facilitou o mapeamento genético permitindo que as sequências gênicas de interesse possam ser identificadas em um único experimento (BAXTER *et al.*, 2012).

Em triatomíneos, pesquisadores utilizam essa tecnologia para identificação de genes que codificam para proteínas salivares por meio do sialotranscriptoma (BUSSACOS *et al.*, 2011; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012). O transcriptoma também ajuda no entendimento da fisiologia do vetor para seu controle na natureza. Outro grupo identificou receptores para proteína que controla a frequência cardíaca em *R. prolixus* e mostrou que a inibição da expressão dessa proteína leva à redução dos batimentos cardíacos do vetor, o que poderia ser usado para o controle dessas populações em áreas endêmicas (LEE, VANDEN BROECK e LANGE, 2013). Outro estudo recente identificou diversas enzimas no trato digestório de *R. prolixus* (RIBEIRO, *et al.*, 2014). O intuito desse trabalho era triar as enzimas envolvidas não apenas na digestão do sangue, mas também na diferenciação das formas de *T. cruzi* durante seu ciclo no inseto. Apesar de não terem uma conclusão direta sobre essas proteínas, foi aberto caminho para novos estudos a partir das que foram identificadas (RIBEIRO, *et al.*, 2014).

A maioria das 19 espécies de *Rhodnius* são consideradas sivistres, porém há adaptação a ambientes peridomiciliares e até mesmo domiciliares devido a alterações do seu *habitat* natural pela urbanização. Além disso, apesar de serem facilmente diferenciadas de outros gêneros de Triatominae, apresentam muitas dificuldades para a distinção específica. Assim, é necessária uma análise genética para identificação precisa das diferentes espécies, bem como para os estudos filogenéticos da subfamília (NEIVA E PINTO, 1923; LENT E WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO *et al.*, 2003). Marcadores moleculares tradicionais auxiliam na identificação e análises filogenéticas, porém ainda não se conseguiu identificar os genes responsáveis pelo isolamento reprodutivo.

A existência de genes em tecidos não-reprodutivos, como cabeça, que estejam sob seleção positiva são interessantes por promover a identificação de fenótipos que possam também afetar o comportamento sexual. Por outro lado, esses genes também podem influenciar funções sensoriais que diferem entre espécies pela existência de diferenças em suas características ecológicas (GREENSPAN E FERVEUR, 2000).

As glândulas salivares de triatomíneos, assim como de outros insetos hematófagos, possuem uma grande variedade de compostos anti-hemostáticos que são injetados no hospedeiro durante a alimentação (AMINO, TANAKA E SCHENKMAN, 2001). Assim, esses vetores são capazes de neutralizar as respostas hemostáticas desencadeadas para evitar a perda sanguínea após lesão de tecidos, pela vasoconstrição, coagulação e agregação plaquetária. A diversidade de transcritos na saliva desses insetos pode revelar uma pluraridade de compostos ativos farmacologicamente e ainda de genes que auxiliariam a

compreensão dos mecanismos evolutivos desses organismos (ASSUMPÇÃO et al 2012).

Como a distância genética entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*, segundo o citocromo b foi baixa, o entendimento das diferenças entre os transcriptomas seria de grande auxílio para esclarecer o processo de especiação e a diferenciação entre as espécies.

4. Objetivos

4.1. Caracterização de transcriptoma de tecidos de cabeça e glândulas salivares de *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

4.2. Buscar diferenças que possam auxiliar no entendimento do processo de diferenciação, bem como para a identificação específica de *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

5. Material e Métodos

5.1. Exemplos

As espécies utilizadas neste estudo são mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara em cubas de vidro fechadas com divisórias internas, identificadas nominal e numericamente (Colônia de Triatomíneos de Araraquara – CTA nº), mensalmente alimentadas com sangue de *Anas platyrhynchos* (patos).

I. *Rhodnius montenegrensis* Rosa et al., 2012

Recentemente descrita, essa espécie foi encontrada no Estado de Rondônia, Região da Amazônia brasileira. Tamanho do macho aproximadamente 18,5 mm e da fêmea de 21,5 mm. A coloração geral do corpo é marrom amarelada com algumas manchas escuras. Pernas amarelas com uma faixa preta na parte posterior da tíbia e uma faixa central, que delimita duas áreas escuras (Figura 1).

Foi utilizada a colônia CTA 088 do Insetário de Triatominae, proveniente do município de Monte Negro, Rondônia, Brasil coletados em 18 de setembro de 2008.

Figura 1: Fêmea de *R. montenegrensis*. A. dorsal; B. ventral (Foto: Rosa *et al.*, 2012)



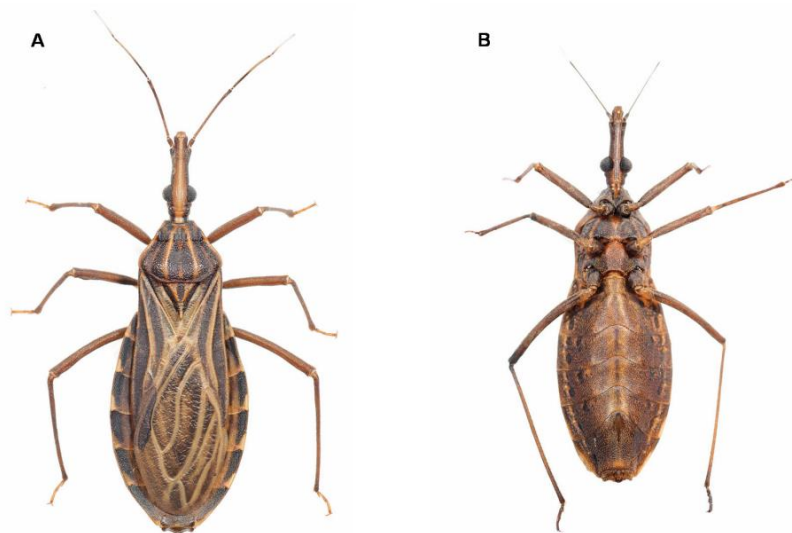
II. *Rhodnius robustus* - Larrouse, 1927

Encontrado na Bolívia, Brasil (Amazonas e Pará), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela. Possui características morfológicas e cromáticas semelhante às de *R. prolixus* (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et

al. 2003). Tamanho do macho de 20-23,5mm e da fêmea de 23-26 mm. A coloração geral do corpo é marrom amarelada com muitas manchas escuras em várias regiões do corpo (Figura 2).

Foi utilizada a colônia CTA 085 do insetário de Triatominae, proveniente do Peru e mantida em laboratório desde 07/02/1972.

Figura 2: Fêmea de *R. robustus*. A. dorsal; B. ventral (Foto: Rosa *et al.*, 2012).



5.2. Dissecação dos insetos

Todos os insetos foram separados ainda como ninfa de 5º estágio e foram alimentados, até sete dias antes da dissecação para evitar contaminação da amostra com sangue do mamífero. Os exemplares foram anestesiados no gelo.

Para a dissecação dos insetos foi utilizado material estéril e o ambiente tratado com RNase exterminator® BioAgency.

Todo o procedimento foi realizado em RNA Holder® BioAgency para evitar a degradação do RNA e as peças mantidas em gelo até o final do procedimento.

As cabeças de machos foram retiradas com deslocamento cervical cuidadosamente para manter a integridade das glândulas salivares.

Após a dissecação as peças foram colocadas em 200 µL da Trizol® e congeladas a -80°C.

5.3. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído a partir de conjuntos de três cabeças, em média, utilizando o protocolo de Trizol / clorofórmio modificado (CHOMCZYNSKI E MACKEY, 1995).

Cada amostra foi descongelada no gelo, macerada e completado o volume de Trizol® para 1000 µl. Após a incubação no gelo por 10 minutos foi centrifugada a 4°C e 10.000g por 2 minutos. Ao sobrenadante transferido para tubo novo foram adicionados 300 µl de Clorofórmio: Álcool Isoamílico 24:1. Após passar rapidamente pelo vórtex foram novamente centrifugados a 4 C° e 10.000g, durante 15 minutos. Essa lavagem foi repetida por duas vezes e a fase aquosa transferida a um tubo com 1 µl de Glicogênio Azure (30 ng/µl).

Para a precipitação foi adicionado Isopropanol na proporção 1:1 de amostra, misturado por inversão 10 vezes e incubado no gelo, por 10 min. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 4 C° em 12.000g, por 10 min. O sobrenadante descartado e o *pellet* lavado por duas vezes com 500 µl EtOH 80%. Após as duas lavagens, o *pellet* foi seco a 60° C (termo-blotting) por 3-5 minutos e ressuspenso em 30µl de água DEPC pré-aquecida à 60° C.

5.4. Purificação do RNA (CATHALA *et al.*, 1983)

Foi adicionado à amostra (de 30 µl) um volume de 15 µl de cloreto de lítio (LiCl) a 7.5M. Após incubação a -20°C, por 30 minutos, a amostra foi submetida à centrifugação a 4°C a 13.000g por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 1ml de etanol 70% gelado. Após a lavagem o *pellet* foi seco à 60° C e ressuspenso em 35 µl de água DEPC pré-aquecida a 60° C.

A qualidade do RNA foi visualmente triada em gel de agarose, quantificada em fluorômetro Qubit enquanto que as medidas ao NanoDrop asseguraram a escolha de amostras com índices próximos a 2.0 nas relações 260/230 e 260/280.

5.5. Sequenciamento em Hi-seq 2500 Illumina

Bibliotecas de RNA-seq foram construídas a partir de um *pool* de amostras (*R. montenegrensis* - sete cabeças para a amostra e seis para a réplica, *R. robustus* - seis cabeças para a amostra e seis para a réplica), que totalizavam 4 µg do RNA total utilizando o TruSeq RNA Sample Prep kit v2 (Illumina) protocolo de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram agrupadas em *pools* de 12 e corridas em uma *lane* de uma *flow cell* na plataforma Illumina HiSeq2500 com 2 x 100 pb *paired-end* (Laboratório de Genômica Funcional Aplicada à Agricultura e Agroenergia, ESALQ-USP, Brasil).

5.6. Análise de bioinformática

As análises bioinformáticas foram realizadas utilizando estrutura computacional do Laboratório de Genética de Populações – UFSCar, supervisionadas pelo Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito, em um servidor Dell

Power Edge T620, com 24 *threads* e 128G de ram.

5.6.1. Filtragem e montagem das sequências – *SeqyClean* e *Trinity*

Todas as *reads* foram aparadas por qualidade *Phred* e filtradas por comprimento usando o programa *SeqyClean*, disponível em <https://bitbucket.org/izhbannikov/seqyclean>. As *reads* mantidas para as análises tiveram um comprimento mínimo de 50 bases, erro permitido 0,01, ou seja, um erro a cada 100 bases (qualidade *Phred* igual a 20) nos interiores das sequências, erro permitido 0,05 nas extremidades. *SeqyClean* também verifica e remove quaisquer sequências adaptadoras do processo de sequenciamento que tenham ficado restantes. Esse programa analisa as duas *reads* do *pair-end* e descarta ambas as sequências se apenas um não cumpre os parâmetros de filtragem estabelecidos. Essa característica é importante para o programa que monta os *contigs*, porque todas as leituras estão emparelhadas e permitem a produção de uma montagem mais eficaz, especialmente na ausência de um genoma de referência.

Para otimizar a montagem dos *contigs* foi feita a normalização das *reads* filtradas usando a ferramenta *insilico_read_normalization.pl* que é parte do pacote do *Trinity* (filtra *reads* repetidas ou redundantes) (GRABHERR *et al.*, 2011). A profundidade utilizada nessa etapa para evitar a redundância foi de até 60 repetições.

As *reads* filtradas e normalizadas foram montadas também usando o programa *Trinity*. Este é especializado para montagem de transcriptomas que possui três passos. O primeiro é *Inchworm* que monta sequências únicas de transcritos. Ele utiliza os *k-mers* em sequência para efetuar a montagem e

reconhece o fragmento mais representativo para a sequência. O segundo é *Chrysalis*, que organiza dos dados em grupos relacionados a cada possível gene (*clusters*) e forma os grafos de Bruijn. Por fim, o terceiro é *Butterfly*, que processa os grafos em paralelo e traça vias de leitura para cada par encontrando as possíveis isoformas e transcritos por *splicing* alternativos e identifica possíveis genes paráloGOs (GRABHERR et al. 2011).

Foram realizadas duas montagens *de novo* com os *reads* das duas réplicas de cada espécie. A profundidade utilizada, para evitar a redundância, foi de até 60 repetições. Para essa montagem colocou-se como tamanho mínimo de *contig* formado de 200 bases.

5.6.2. Alinhamento das Sequências - *Bowtie2*

Bowtie2 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012) é um programa que alinha sequências produzidas no sequenciamento Illumina de duas formas: a primeira é de acordo com uma referência, ou seja, se o organismo estudado já possui um genoma de referência, ele monta o transcriptoma de acordo com esse genoma; a outra forma é montar uma referência, a partir dos dados gerados pelo Illumina, chamado como *de novo*. Essa estratégia é muito eficaz no estudo de transcriptomas e o *Bowtie2* possui a capacidade de mapear as *reads* na montagem que foi produzida pelo *Trinity*. Para evitar redundância no mapeamento da montagem de *R. robustus*, filtraram-se as maiores isoformas por cada "unigene" detectado durante o processo de montagem. Assim, obteve-se um transcrito por cada conjunto de isoformas ("unigene"). As *reads* filtradas de cada espécie foram mapeadas contra a montagem de *R. robustus*, tomada como transcriptoma-referência, usando as opções *default* do programa *Bowtie2*.

5.6.3. Busca de Variantes - *VarScan2*.

VarScan2 (KOBOLDT *et al.*, 2012) é um programa que detecta variantes (SNPs - *Single Polymorphism Nucleotide* ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único) nos dados gerados pelo sequenciamento de próxima geração.

Para essas análises, converteu-se os arquivos gerados para os adequados utilizando a ferramenta *SamTools* e a opção *samtools_view*.

Os arquivos convertidos foram utilizados para a pesquisa de SNPs utilizando o comando *mpileup2SNP* do *VarScan2*. Para uma análise mais acurada, filtrou-se as isoformas que compartilham regiões a fim de evitar redundância de fragmentos. Assim, obteve-se um transcrito por cada conjunto de isoformas (“gene”). Na análise utilizou-se uma cobertura mínima de 42, qualidade de mapeamento maior que 30 e qualidade *Phred* maior que 30.

Para selecionar um grupo de transcritos candidatos que apresentaram maior nível de divergência entre as duas espécies, estimou-se o índice de diferenciação interespecífica (D) (RENAUT, NOLTE E BERNATCHEZ, 2010; ANDRÉS *et al.*, 2013) baseando-se nas frequências alélicas estimadas no *VarScan2*. A variável D é definida como o valor absoluto da diferença entre as frequências alélicas de um SNP de *R. montenegrensis* e *R. robustus* ($D = |FR_m - FR_r|$). Também foi calculado o \bar{D} que é o valor médio de D para os SNPs de um transcrito particular (ANDRÉS *et al.*, 2013). Para a pesquisa dos possíveis candidatos envolvidos no processo de especiação foi utilizado $\bar{D} = 100$ como limitante. Esse foi, portanto, o valor limiar para separar transcritos divergentes.

5.6.4. Predição de regiões codificantes (CDS)

Foi feita a predição das regiões codificantes (*open reading frames* “ORFs”) para as montagens por espécie usando a ferramenta TransDecoder incluída no pacote do *Trinity*, mantendo-se CDSs iguais ou maiores de 100 resíduos de aminoácidos.

5.6.5. Avaliação da qualidade da montagem e anotação do transcriptoma por BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs)

BUSCO é uma ferramenta que avalia a qualidade das montagens e anotações de genomas e transcriptomas a partir da pesquisa de CDS completos referentes genes ortólogos conservados. (SIMÃO *et al.*, 2015).

5.6.6. Anotação funcional

Blastx é uma ferramenta para localizar regiões semelhantes em um banco de dados de proteínas não redundante (NR) do NCBI. Das sequências semelhantes filtrou-se apenas as 20 primeiras mais semelhantes e para as análises utilizou-se apenas a primeira de cada sequência. Foi realizada uma pesquisa de sequências semelhantes às CDSs encontradas contra o banco de dados de proteínas não-redundantes (NR) do *GenBank* e para validar as montagens feitas por bioinformática, foi feita uma análise de homologia com o genoma de *R. prolixus* (MESQUITA *et al.*, 2015) e disponível em *VectorBase* (<https://www.vectorbase.org/>) utilizando o programa *Blastn* e um limiar de *e-value* de 10^{-6} .

Gene Ontology é uma ferramenta utilizada na análise de transcriptomas que tem o intuito de fornecer um vocabulário controlado de **termos** definidos que representam as propriedades do produto do gene. Estes termos estão

separados em três domínios: **Componente Celular** que indicam as partes de uma célula ou do seu ambiente extracelular; **Função Molecular** que são os relacionados à atividade de um produto gênico em nível molecular; e **Processo Biológico** são os “unigenes” relacionados à função em determinada fase de unidades de vida: células, tecidos, órgãos e organismos (ASHBURNER *et al.*, 2000). A ontologia GO está estruturada como um gráfico acíclico dirigido, em que cada termo definiu as relações a um ou mais outros termos no mesmo domínio, e às vezes para outros domínios. O vocabulário GO é projetado para ser geral para cada domínio, e inclui condições aplicáveis aos procariotas e eucariotas, e organismos individuais e multicelulares. A anotação funcional visando associar os termos da *Gene Ontology* com cada CDS foi realizada com o programa *Blast2GO* (CONESA *et al.*, 2005). As anotações obtidas pelo passo anterior foram analisadas por software *WEGO* (<http://weGO.genomics.org.cn/cgi-bin/weGO/index.pl>) para exibir a distribuição de dos termos da GO do nível 2 encontrados nos transcriptomas de cada uma das espécies. Foi realizada ainda a análise de enriquecimento dos termos do GO, ou seja, uma análise que permite encontrar os termos do GO que estão super-representados usando anotações para o correspondente conjunto de genes. Para isso, utilizou-se um *p-value* de 0,05 e foi realizada por meio do programa *TopGO*.

5.6.7. Teste de seleção Ka/Ks

A relação Ka / Ks usada para indicar a pressão seletiva em um gene que codifica uma proteína. É calculada como a razão entre o número de substituições não sinônimas (Ka), num dado período de tempo, pelo número de substituições

sinônimas (KS), no mesmo período. Uma razão maior que 1 indica seleção positiva; menor que 1 indica seleção estabilizadora, ou seja, contra a alteração; e uma proporção igual a 1 indica seleção neutra. Utilizamos esse teste para avaliar dentro dos transcriptomas estudados quais genes estariam sob pressão positiva (LI, WU E LUO, 1985).

6. Resultados

6.1. Montagem de transcriptoma *De novo*

As quatro bibliotecas de RNA (duas réplicas por espécie) geraram 131.250.862 *Paired-end reads* de 100 pares de bases (pb) que representam em média 32,8 milhões de *reads* por biblioteca. Esses *reads* gerados foram então filtrados por qualidade, resultando em 124.601.286 *Paired-end reads* e mais de 31 milhões de *reads* em média por réplica nas duas espécies estudadas. Após a normalização obteve-se 13.840.560 *paired-end reads*. Os resultados das duas montagens diferentes aqui feitas: I. *R. robustus* (Rr) e II. *R. montenegrensis* (Rm); estão mostrados na Tabela 1. A integralidade da montagem do genoma foi avaliada utilizando BUSCO, uma ferramenta que verifica o genoma relativamente à presença de grupos ortólogos conservados de cópia única. De 2.675 ortólogos de cópia única, 80% estavam completos na montagem de Rr (Tabela 1), e 6,9% eram BUSCOs fragmentados. Apenas 12% dos ortólogos não foram recuperados do genoma. Para Rr, 81% estavam completos na montagem (**Tabela 1**), e 7,0% eram BUSCOs fragmentados. Apenas 11% dos ortólogos foram perdidos do genoma.

Tabela 1: Resumo estatístico das montagens de tecido de cabeça e glândula salivar de *R. montenegrensis* (Rm) e *R. robustus* (Rr).

	Rm	Rr
<i>Reads</i> totais	32.502.355	33.123.076
<i>Reads</i> filtrados por qualidade	30.772.029	31.528.614
<i>Reads</i> depois da normalização x 2 <i>reads</i>	6.543.879	7.296.681
Total trinity 'unigenes'	53.042	56.756
Total trinity transcripts	64.952	70.894
Percent GC	34,66	34,68
N50	2.083	2.134
<i>Contigs</i> maiores que 1000 bp	19.838	21.652
<i>Contigs</i> maiores que 2000 bp	9.903	10.918
Média (bp)	477	480
Mediana (bp)	1.046	1.057
Total assembled bases	67.920.294	74.955.989
Maior <i>contig</i>	32.076	30.264
BUSCOs completos	80%	81%

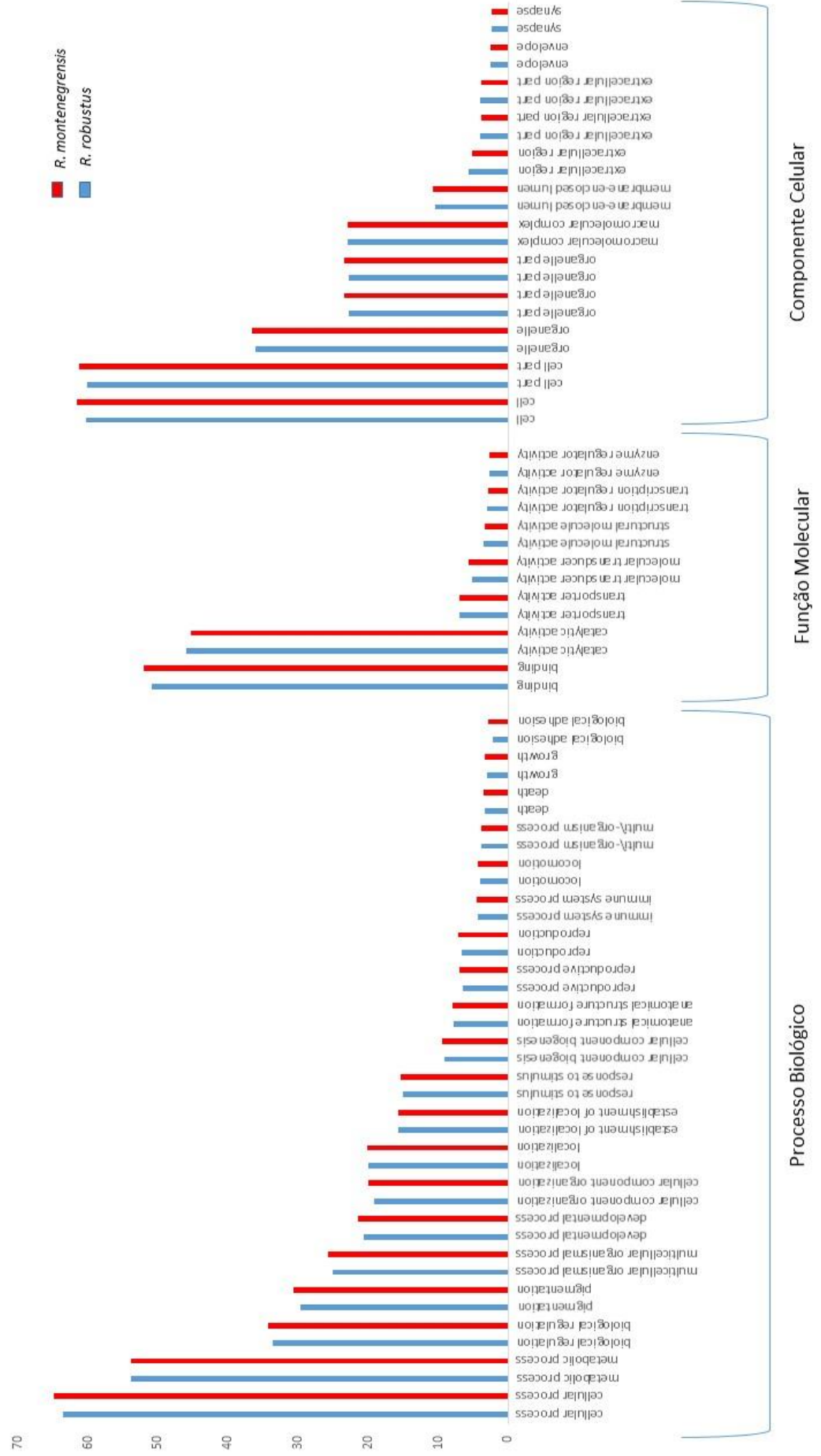
6.2. Regiões codificantes (CDS) e anotação funcional

Com a ferramenta TransDecoder foram encontradas 27.150 CDS na montagem de *R. montenegrensis* (Rm), 28.965 na montagem de *R. robustus* (Rr), sendo 17.207 e 18.806 CDSs completos, respectivamente, ou seja, possuíam códons iniciadores e terminais. Quando feita a pesquisa com o Blast, 16.057 CDS em Rm e 16.781 CDS em Rr apresentaram sequências semelhantes no banco de dados NR. E desses 10.442 em Rm e 10.828 em Rr tiveram anotações funcionais relacionadas com termos do *Gene Ontology*. Além disso, 2.412 CDS em Rm e 2.447 CDS em Rr estão relacionados com códigos enzimáticos na base de dados do KEGG.

A análise de similaridade com o genoma de *R. prolixus* mostrou que dos 45.912 *contigs* utilizados para fazer o Blastn 22.856 foram 100% similares, em *R. robustus*. Em *R. montenegrensis* 42.758, 7406 foram 100% de similaridade. Além disso, todos os *contigs* analisados tiveram similaridade acima de 70 % entre as espécies estudadas e o genoma referido.

As CDS anotadas também foram distribuídas em 55 cateGORias diferentes do GO pelo software WEGO, pertencentes as três grandes classes: 18 em Processo Biológico, 24 em Função Molecular e 13 em Componente Celular. Da classe Processo Biológico, a cateGORia “Processo Celular” (*Cellular Process*) foi a mais representativa, associada com 64,9% das CDSs para Rm e 63,5% das CDSs para Rr. Na classe Função Molecular a maioria dos transcritos anotados estão associados à cateGORia “Ligação” (*Binding*) com 52% em Rm e 50,9% em Rr. Na classe Componente Celular, a cateGORia “Partes Celulares” (*Cell Part*) associou 61,5% dos transcritos para Rm e 61,2% para Rr (Figura 3).

Figura 3: Termos do GeneOntology encontrados para as regiões codificantes de *R. montenegrensis* e *R. robustus*.



6.3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs) encontrados

Nas montagens, foram encontrados 13.696 SNPs em 2.196 *contigs*. Baseado no cálculo dos índices de diferenciação (D e \bar{D}), observou-se que a maioria dos SNPs compartilhados entre *R. montenegrensis* e *R. robustus* têm valor absoluto da diferença de frequências (D) acima de 95% (5.552) e desses 3.055 com D igual a 100%, ou seja, diferenças interespecíficas fixadas (Figura 4). Levando-se em conta o índice médio (\bar{D}) por *contig* que considera os valores de D de todos os SNPs por *contig*, foram identificados 558 *contigs* (do total de 2.196) que possuem \bar{D} acima de 90% e 216 com $\bar{D} = 100\%$ (Figuras 4 e 5). Vale ressaltar que dos 216 *contigs*, 160 apresentaram três ou mais SNPs (Figura 6). Nota-se que a distribuição de D seria constante se não fosse pelo pico representado pelos SNPs com maior diferenciação (D $\geq 95\%$) (Figura 4).

Figura 4: Valor absoluto da diferença de frequências (D) dos alelos em 13.696 SNPs compartilhados entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

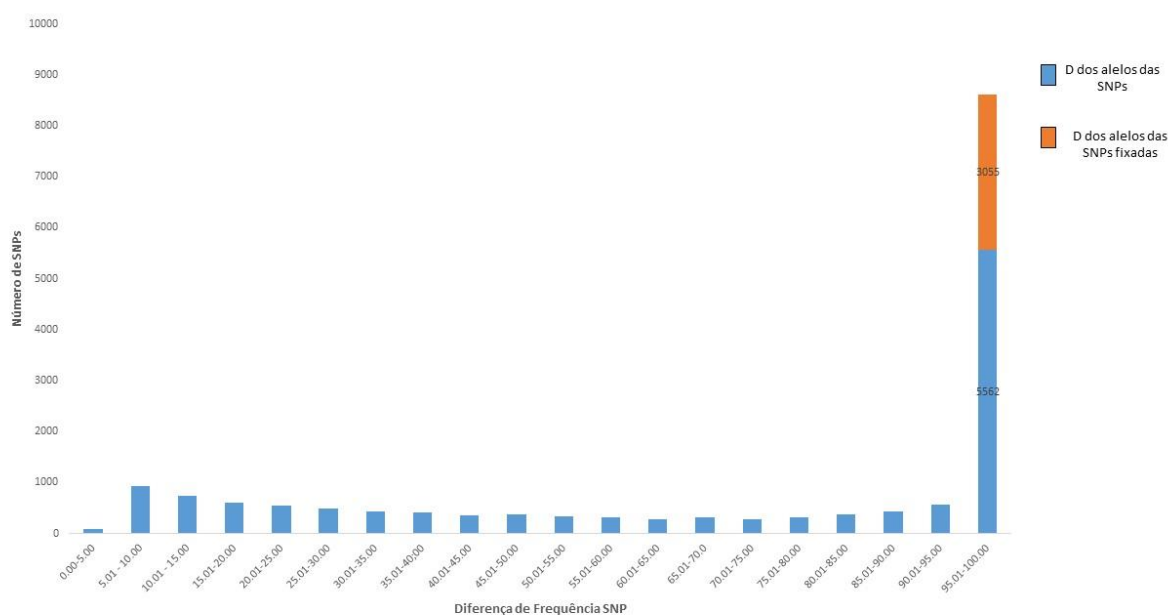


Figura 5: Diferença média de frequência dos alelos dos transcritos (\bar{D}) entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

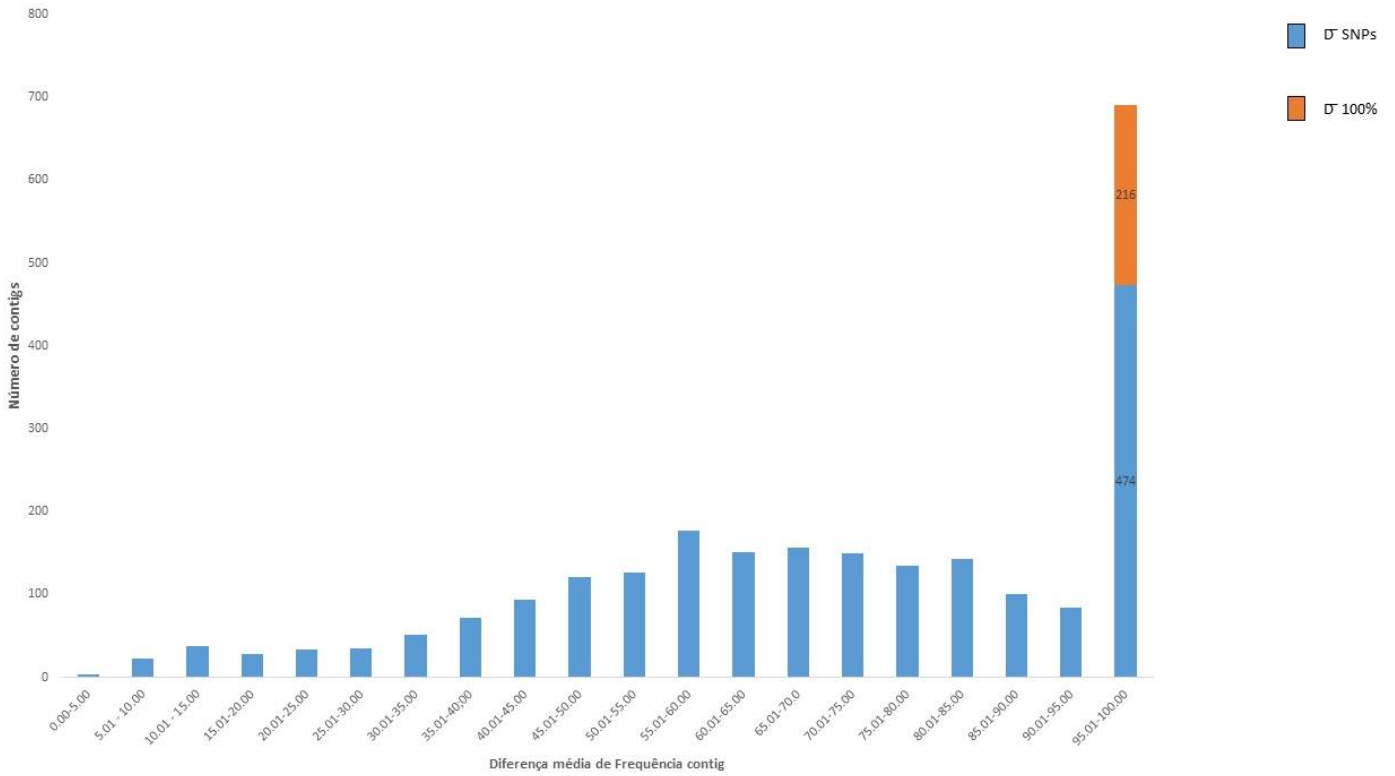
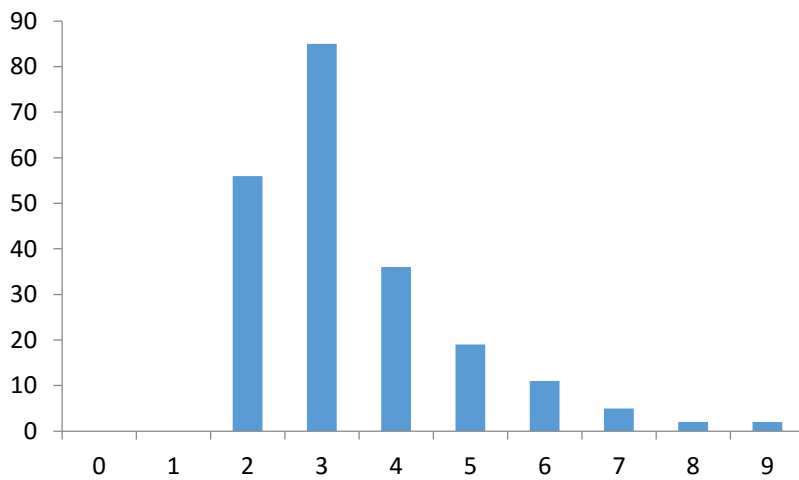


Figura 6: Distribuição de SNPs por contig.



6.4. Anotação funcional dos *contigs* $\bar{D} = 100\%$

Através da análise de enriquecimento dos *contigs* 100% diferenciados encontramos 8 genes, interessante, todos pertencentes ao complexo AP-clatrina (Tabela 2).

Tabela 2: Anotação pelo programa BlastX dos *contigs* com 100% de diferença após o enriquecimento com o *TopGO*.

GO Term	Nome da categoria	CateGOria principal	e value
GO:0030128	<i>clathrin coat of endocytic vesicle</i>	Componente Celular	0,01278887
GO:0030122	<i>AP-2 adaptor complex</i>	Componente Celular	0,01278887
GO:0045334	<i>clathrin-coated endocytic vesicle</i>	Componente Celular	0,02489061
GO:0030669	<i>clathrin-coated endocytic vesicle membrane</i>	Componente Celular	0,02489061
GO:0030132	<i>clathrin coat of coated pit</i>	Componente Celular	0,02489061
GO:0030666	<i>endocytic vesicle membrane</i>	Componente Celular	0,0423901
GO:0030125	<i>clathrin vesicle coat</i>	Componente Celular	0,0423901
GO:0005905	<i>coated pit</i>	Componente Celular	0,0423901

6.5. Teste de seleção Ka/Ks

Encontrou-se 560 genes sob seleção positiva, ou seja, Ka/Ks maior que 1. Dentre esses destacamos os 7 que codificam para proteínas sabidamente importantes (Tabela 3).

Tabela 3: Anotação e função dos 7 *contigs* sabidamente importantes com Ka/Ks maior que 1.

<i>Contig</i>	Anotação	Função
c12445_g1_i1	salivary kazal-type proteínase inhibitor	anticoagulante, vasodilatador e atividades antimicrobianas (Watanabe <i>et al.</i> , 2010)
c18759_g1_i1 c18753_g2_i1	salivary lipocalin	transportadores de compostos hidrofóbicos em fluidos biológicos aquosos, e como proteína de ligação à ferormônio sexual (Seo <i>et al.</i> , 2011).
c29260_g1_i1	odorant-binding protein precursor	RproOBP4 Precursor para proteína ligante de odores e/ou ferormônios (Vogt, Prestwich e Lerner, 1991).
c15932_g1_i1	hemolysin-like secreted salivary protein 2	toxina de formação de poros e é frequentemente descrita em microrganismo (GOuaux, 1998)
c16004_g3_i2	heme-binding protein	evita o dano oxidativo induzido-heme para lipophorin (Dansa-Petretski <i>et al.</i> , 1995).
c11608_g1_i1	Diptericin	Peptídeo anti-bacteriano (Lee <i>et al.</i> , 2001).
c18753_g2_i1	nitrophorin 3B	Ação antihemostática (Montfort, Weichsel e Andersen, 2000).

7. Discussão

O gênero *Rhodnius* também é conhecido pela dificuldade de diferenciação interespecífica. As espécies desse estudo foram escolhidas exatamente por exemplificarem muito bem essa dificuldade. *Rhodnius montenegrensis*, antes de sua descrição, era identificado como *R. robustus* devido à semelhança morfológica. *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927 que é encontrado na Bolívia, Brasil (Amazonas e Pará), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela, apresenta características morfológicas e

cromáticas semelhantes às de *R. prolixus* (LENT E WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO *et al.*, 2003) e de *R. montenegrensis*. Com o intuito de auxiliar no entendimento e identificação dessas espécies, e, posteriormente, de outras espécies e de outros gêneros, foi realizado o presente estudo utilizando uma nova tecnologia de estudo de transcriptomas.

A base de dados deste trabalho foi construída por metodologia de sequenciamento de mRNA (RNA-Seq), a partir de quatro bibliotecas e dois perfis de cDNA obtidos de *pool* de cabeça e glândulas salivares de machos de *R. montenegrensis* e *R. robustus* com réplicas. Para *R. robustus* existe um trabalho de sialotranscriptoma feito apenas para descrição de proteínas salivares e sem nenhum foco evolutivo (BUSSACOS *et al.*, 2011). Por outro lado, *R. montenegrensis* é uma espécie recentemente descrita e não conta com dados na literatura e nenhum de transcriptoma. Portanto, as bibliotecas de tecidos cefálico e de glândulas salivares, aqui descritas, fornecem uma triagem de transcritos em triatomíneos e permite novos estudos com essas espécies.

A montagem construída neste estudo está de acordo com outras construídas para estudos similares em outras classes de organismos em relação ao N50, em estudos similares, foi de aproximadamente 1700, e o encontrado nesse estudo foi de mais de 2000. Importante observar que dos CDS encontradas 63% em Rm e 65% Rr eram completos, demonstrando que a montagem foi de boa qualidade (REZENDE, 2014; XIANJUN *et al.*, 2014; SHIEL *et al.*, 2015). Além disso, por meio da ferramenta BUSCO, observamos um ótimo aproveitamento das montagens sendo 80% dos ortólogos de cópia única em Rm e 81% em Rr eram completos. Os 12% e 11%, respectivamente, de CDS não encontradas pelo BUSCO era esperada por ser um estudo de apenas

tecidos de cabeça e, portanto, não termos os genes expressos em outros tecidos.

A pesquisa dessas CDS em banco de dados de proteínas não redundantes encontrou 16.057 CDS em Rm e 16.781 CDS em Rr sequências semelhantes com vários organismos, inclusive triatomíneos. E desses 10.442 em Rm e 10.828 em Rr tiveram anotação funcional relacionadas com termos do *Gene Ontology* (Figura 3). Além disso, 2.412 CDS em Rm e 2.447 CDS em Rr estão relacionados com códiGOs enzimáticos na base de dados do KEGG.

Com a análise de enriquecimento de termos do GO observou-se que os oito termos que se apresentaram são associados ao complexo de receptores de membrana, AP-Clatrina (Tabela 2). Esse complexo é relacionado ao transporte de substâncias dentro da célula por estar envolvido na formação de vesículas de transporte formadas a partir do complexo de Golgi e também formada durante a endocitose (LI *et al.*, 2015). Foi demonstrado que a endocitose de RNAi *refractoriness* em *Bactrocera dorsalis* é dependente de clatrina (LI *et al.*, 2015). Essa proteína também foi encontrada em *Drosophila* (CHANG *et al.*, 2002) e no transcriptoma de trato digestório de *R. prolixus*.

Muitas proteínas de importância biológica também foram encontradas neste estudo. Como esse estudo teve o interesse no processo de especiação, fizemos o Ka/Ks para identificar as proteínas que estariam sobre seleção positiva, dentre essas, destaca-se algumas das proteínas de *contigs* com Ka/Ks maior que 1 (Tabela 4):

Inibidor de proteinase *kazal-type* salivar: encontrada em vários transcriptomas de insetos, incluindo *Aedes aegypti*, *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. matogrosensis* e *P. megistus* (RIMPHANITCHAYAKIT E TASSANAKAJON,

2010; WATANABE *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012; RIBEIRO, J. M. *et al.*, 2014; RIBEIRO, SCHWARZ E FRANCISCHETTI, 2015), com a função conhecida de anticoagulante, vasodilatador e atividades antimicrobianas e são encontradas em glândulas salivares de insetos hematófagos (WATANABE *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Lipocalina salivar: A família lipocalina é bem difundida em procariontes e eucariotes, caracteriza-se por possuir uma estrutura em cilindro, bastante conservada, com aminoácidos hidrofóbicos em seu interior. Essa estrutura permite transportar compostos hidrofóbicos em fluidos biológicos aquosos. Em *R. prolixus*, por exemplo, foi observado a presença de lipocaninas ligadas a óxido nítrico com a função vasodilatadora e inibidora de agregação plaquetária no hospedeiro vertebrado (RIBEIRO *et al.*, 2012). Pela afinidade hidrofóbica, foi descrita também como proteína de ligação à feromônio sexual (SEO *et al.*, 2011). Também foi encontrada em transcriptoma de *T. rubida* e *P. megistus* (RIBEIRO ET AL., 2012; RIBEIRO, J. M. ET AL., 2014; RIBEIRO, SCHWARZ E FRANCISCHETTI, 2015).

Precursor de Odorant-binding protein (OBP) RproOBP4: Precursor para proteína ligante de odores e/ou feromônios (VOGT, PRESTWICH E LERNER, 1991). Porém, no intestino de *R. prolixus* foram encontradas algumas OBPs que estariam relacionadas ao transporte de nutrientes ou outras moléculas envolvidas na coordenação da função fisiológica do intestino (RIBEIRO, J. M. *et al.*, 2014).

Proteína salivar semelhante a hemolisina 2: Em microorganismos é descrita como uma toxina de formação de poros (GOUAUX, 1998). Não se sabe a função desta proteína em triatomíneos, porém, alguns autores acreditam que

possa estar envolvida na lise de hemácias (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008). Encontrada também em *P. megistus*, *T. matogrosensis* e *R. prolixus* (RIBEIRO *et al.*, 2012; RIBEIRO, SCHWARZ E FRANCISCHETTI, 2015).

Proteína ligante de Heme: As proteínas ligantes de Heme podem ligar-se ao óxido nítrico evitando a agregação plaquetária e promovendo a vasodilatação hospedeiro vertebrado (CHAMPAGNE, NUSSENZVEIG E RIBEIRO, 1995). Em *R. prolixus* foi demonstrado que essas proteínas inibem a peroxidação dependente de heme da principal lipoproteína da hemolinfa e isso evita o dano oxidativo induzido por heme durante todo o período de alimentação (DANSA-PETRETSKI *et al.*, 1995).

Diptericin: Peptídeo relacionado ao sistema imunológico do inseto, tem ação anti-bacteriana (LEE *et al.*, 2001). Encontrado no sialotranscriptoma de *P. megistus* (RIBEIRO, SCHWARZ E FRANCISCHETTI, 2015) e em *Drosophila* (LEE *et al.*, 2001; RIBEIRO, SCHWARZ E FRANCISCHETTI, 2015).

Nitroforinas: São lipocalinas que se ligam ao óxido nítrico, portanto tem ação antihemostática, comumente encontradas em artrópodes hematófagos, entre estes *R. prolixus* e *P. megistus* (MONTFORT, WEICHSEL E ANDERSEN, 2000; RIBEIRO, J. M. *et al.*, 2014; RIBEIRO, SCHWARZ E FRANCISCHETTI, 2015).

Além disso, durante o processo de especiação, espera-se que apenas algumas variantes no genoma estejam fixadas nas duas espécies que divergiram. Assim, espécies recentes iriam mostrar apenas algumas *SNPs* fixadas e, com novas barreiras de reprodução, mais diferenças seriam fixadas nesses genomas. Se *R. montenegrensis* e *R. robustus* fossem a mesma espécie era esperada uma distribuição D próxima à normalidade com poucos *SNPs*

fixados. No entanto, os resultados mostraram que mais de 30% dos *SNPs* estão fixadas nessas duas espécies, o que indica mais de 7000 transcritos com uma média $D > 95\%$ (Figura 6). O fato de se ter múltiplos *SNPs* fixados num mesmo *contig* é particularmente interessante pois isso pode indicar a ocorrência de forte seleção favorecendo a fixação de variantes em diferentes espécies. Estudos anteriores realizados com duas espécies de grilos, *Gryllus firmus* e *G. pennsylvanicus* estreitamente relacionadas e com aproximadamente 20% de *SNPs* fixadas teriam divergido há muitos anos (ANDRÉS *et al.*, 2013), portanto *R. montenegrensis* e *R. robustus*, além de comprovadamente espécies diferentes, poder ter divergido há mais tempo que o previsto.

Esses dados, portanto, comprovam que essas duas espécies já haviam sido diferenciadas há muito mais tempo do que se imaginava, como também observado por estudo de citogenética (ALEVI, RAVAZI, *et al.*, 2015).

Os resultados deste trabalho demonstram e comprovam que *R. montenegrensis* e *R. robustus* não só são espécies distintas, mas também que já divergiram há muito tempo derrubando a teoria de ABAD-FRANCH *et al.* (2013) que afirma *R. montenegrensis* ser uma subpopulação de *R. robustus*. Além disso, esses resultados muito contribuem para uma melhor compreensão sobre os estudos filogenéticos dos triatomíneos e conseqüentemente para o controle da transmissão da doença de Chagas. O trabalho conduzido identificou vários genes que são potencialmente envolvidos com a maturação e que deverão ser investigados no processo de diferenciação entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

8. Conclusão

Os resultados obtidos por meio do estudo do transcriptoma das regiões das cabeças de *R. montenegrensis* e *R. robustus* sugerem que essas duas espécies são geneticamente diferenciadas, como já evidenciado pelos caracteres morfológicos, estudos morfométricos e moleculares.

9. Desafios encontrados no decorrer do estudo

O primeiro desafio foi entender o funcionamento da tecnologia escolhida e desenhar o estudo dentro de infinitas possibilidades de perguntas.

Depois veio a etapa mais demorada e trabalhosa, a padronização e extração das amostras. Para a padronização demorou-se pouco mais de 14 meses, já que não se encontrou na literatura nenhum trabalho com extração de RNA de cabeça completa de triatomíneos. A principal dificuldade foi isolar a alta pigmentação que se obtinha juntamente com o RNA extraído. Após várias tentativas utilizando-se *Kits* de extração e também de purificação, além de alguns protocolos utilizados em plantas e sangue, o problema foi solucionado retirando os olhos compostos, já que possuem alta concentração de pigmentos.

O terceiro grande desafio, foi o número de indivíduos e o ciclo biológico dos mesmos, já que cada ciclo é de aproximadamente 6 meses, portanto precisou-se de quase um ano para obtermos todas as amostras nas qualidades requeridas.

Por fim, a bioinformática, com o auxílio fundamental do M.Sc. Carlos Congrais e do Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito, foi realizada em um trabalho *longo* e cuidadoso que ainda se estenderá por mais algum tempo.

Todas essas questões e dificuldade nos fazem acreditar que a ciência é fascinante e gratificante!

10. Referências Bibliográficas

- ♦ ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77(3), n. 0001-3765, p. 17, 2005.
- ♦ ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102 Suppl 1, p. 57-70, Oct 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906805> >.
- ♦ 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. 110, n. 2-3, p. 159-77, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18619938> >.
- ♦ ABAD-FRANCH, F. et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108 Suppl 1, p. 92-99, 2013 Dec 2013. ISSN 1873-6254. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473808>>.
- ♦ AGUILAR, H. M. et al. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102 Suppl 1, p. 47-56, Oct 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891274> >.
- ♦ ALEVI, K. C. et al. Karyotype of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Triatominae). *Genet Mol Res*, v. 14, n. 1, p. 222-6, 2015. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25729953> >.
- ♦ ALEVI, K. C. et al. Entoepidemiology of Chagas disease in the Western region of the State of São Paulo from 2004 to 2008, and cytogenetic analysis in *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Triatominae). *Genet Mol Res*, v. 14, n. 2, p. 5775-84, 2015. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125776> >.
- ♦ AMINO, R.; TANAKA, A. S.; SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol*, v. 31, n. 4-5, p. 465-72, Mar 2001. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222956> >.
- ♦ ANDRADE, C. E. M. et al. Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 48, n. 6, p. 706-15, Dec 2015. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26676495> >.
- ♦ ANDRÉS, J. A. et al. Patterns of transcriptome divergence in the male accessory gland of two closely related species of field crickets. *Genetics*, v. 193, n. 2, p. 501-13, Feb 2013. ISSN 1943-2631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172857> >.
- ♦ ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, v. 25, n. 1, p. 25-9, May 2000. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802651> >.
- ♦ ASSUMPÇÃO, T. C. et al. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fOG selvagem in South America. *Am J Trop Med Hyg*, v. 86, n. 6, p. 1005-14, Jun 2012. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665609> >.
- ♦ ASSUMPÇÃO, T. C. et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 38, n. 2, p. 213-32,

- Feb 2008. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/18207082> >.
- ♦ BARBOSA, R. L. et al. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. *J Food Prot*, v. 75, n. 3, p. 601-6, Mar 2012. ISSN 1944-9097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22410239> >.
 - ♦ BARONA-VILAR, C. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Latin American women and congenital transmission rate in a non-endemic area: the experience of the Valencian Health Programme (Spain). *Epidemiol Infect*, v. 140, n. 10, p. 1896-903, Oct 2012. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22129521> >.
 - ♦ BAXTER, S. et al. Barriers and facilitators to the use of high-technology augmentative and alternative communication devices: a systematic review and qualitative synthesis. *Int J Lang Commun Disord*, v. 47, n. 2, p. 115-29, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1460-6984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22369053> >.
 - ♦ BOKULICH, N. A. et al. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e36357, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22563494> >.
 - ♦ BRAS, J.; GUERREIRO, R.; HARDY, J. Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 13, n. 7, p. 453-64, Jul 2012. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22714018> >.
 - ♦ BUSSACOS, A. C. et al. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. *J Proteomics*, v. 74, n. 9, p. 1693-700, Aug 2011. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/21601023> >.
 - ♦ BUTLIN, R.; RITCHIE, M. G. Evolutionary biology. Searching for speciation genes. *Nature*, v. 412, n. 6842, p. 31, 33, Jul 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11452287> >.
 - ♦ CARREA, A.; DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, v. 11, n. 1, p. e0146947, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/26752404> >.
 - ♦ CARVALHO, D. B. 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 invasions in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. *Acta Trop*, v. 130C, p. 35-38, Oct 2013. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24145156> >.
 - ♦ CATHALA, G. et al. A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA*, v. 2, n. 4, p. 329-35, 1983. ISSN 0198-0238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/6198133> >.
 - ♦ CAVALIER-SMITH, T. et al. Multigene eukaryote phylogeny reveals the likely protozoan ancestors of opisthokonts (animals, fungi, choanozoans) and Amoebozoa. *Mol Phylogenet Evol*, v. 81, p. 71-85, Dec 2014. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/25152275> >.
 - ♦ 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 59, 1909.
 - ♦ CHAMPAGNE, D. E.; NUSSENZVEIG, R. H.; RIBEIRO, J. M. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*, v. 270, n. 15, p. 8691-5, Apr 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/7721773> >.

- ♦ CHANG, H. C. et al. Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *J Cell Biol*, v. 159, n. 3, p. 477-87, Nov 2002. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/12427870> >.
- ♦ CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, v. 19, n. 6, p. 942-5, Dec 1995. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/8747660> >.
- ♦ CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, v. 21, n. 18, p. 3674-6, Sep 2005. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/16081474> >.
- ♦ COURA, J. R. et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*, v. 18, n. 4, p. 171-6, Apr 2002. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11998705> >.
- ♦ COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20571554> >.
- ♦ DA ROSA, J. A. et al. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. *Parasit Vectors*, v. 7, p. 17, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24405517> >.
- ♦ DA SILVA, I. G.; LUQUETTI, A. O.; DA SILVA, H. H. [Importance of the method for obtaining feces from triatominae in the assessment of triatomine susceptibility to *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 26, n. 1, p. 19-24, 1993 Jan-Mar 1993. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/8115684> >.
- ♦ DANSA-PETRETSKI, M. et al. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J Biol Chem*, v. 270, n. 18, p. 10893-6, May 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/7738029> >.
- ♦ DIAS, J. C. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica*, v. 22, n. 10, p. 2020-1, Oct 2006. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/16951867> >.
- ♦ DIAS, J. C. et al. [General situation and perspectives of chagas disease in Northeastern Region, Brazil]. *Cad Saude Publica*, v. 16 Suppl 2, p. 13-34, 2000. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11119317> >.
- ♦ DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J. [The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 31, n. 4, p. 373-83, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/9662965> >.
- ♦ DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 603-12, Jul 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/12219120> >.
- ♦ DILLY, G. F.; GAITÁN-ESPITIA, J. D.; HOFMANN, G. E. Characterization of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) transcriptome and mitogenome: a molecular resource for phylogenetics, ecophysiology and global change biology. *Mol Ecol Resour*, v. 15, n. 2, p. 425-36, Mar 2015. ISSN 1755-0998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/25143045> >.
- ♦ FEDER, J. L.; EGAN, S. P.; NOSIL, P. The genomics of speciation-with-gene-flow. *Trends Genet*, v. 28, n. 7, p. 342-50, Jul 2012. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22520730> >.
- ♦ FEDER, J. L.; NOSIL, P. The efficacy of divergence hitchhiking in generating genomic islands during ecological speciation. *Evolution*, v. 64, n. 6, p. 1729-47, Jun 2010. ISSN 1558-5646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20624183> >.
- ♦ FEITOSA, V. R. Implantação de um sistema

- ♦ de Vigilância Epidemiológica (VE) de doença de Chagas na Amazônia. Rio de Janeiro: Soc Brás Méd Trop. 28 (III): 84-87 p. 1995.
- ♦ FUTUYMA, D. *Biologia evolutiva*. 1. São Paulo SP Brasil: Soc. Bras Genética, 1995. 646p.
- ♦ GALVÃO, C. et al. A Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, v. 202, p. 36, 2003.
- ♦ GOUAUX, E. alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol*, v. 121, n. 2, p. 110-22, 1998. ISSN 1047-8477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/9615434> >.
- ♦ GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, v. 29, n. 7, p. 644-52, Jul 2011. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/21572440> >.
- ♦ GREENSPAN, R. J.; FERVEUR, J. F. Courtship in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, v. 34, p. 205-232, 2000. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11092827> >.
- ♦ GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med*, v. 2012, p. 705326, 2012. ISSN 1687-9694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22523500> >.
- ♦ JUNQUEIRA, A. C.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol*, v. 21, n. 6, p. 270-2, Jun 2005. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/15922247> >.
- ♦ KOBOLDT, D. C. et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*, v. 22, n. 3, p. 568-76, Mar 2012. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22300766> >.
- ♦ KUADKITKAN, A. et al. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*, v. 406, n. 1, p. 149-61, Oct 2010. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20674955> >.
- ♦ LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, v. 9, n. 4, p. 357-9, Apr 2012. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22388286> >.
- ♦ LEE, D.; VANDEN BROECK, J.; LANGE, A. B. Identification and expression of the CCAP receptor in the Chagas' disease vector, *Rhodnius prolixus*, and its involvement in cardiac control. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e68897, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/23874803> >.
- ♦ LEE, J. H. et al. Diptericin-like protein: an immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*. *Gene*, v. 271, n. 2, p. 233-8, Jun 2001. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11418244> >.
- ♦ LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 163 n 3, p. 397, 1979.
- ♦ LEWINSOHN, R. *Do caldo de cana ao suco de açaí*. NN. NN. Campinas SP Brasil: J. Unicamp. 283: 2 nn p. 2005
- ♦ LI, W. H.; WU, C. I.; LUO, C. C. A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol*, v. 2, n. 2, p. 150-74, Mar 1985. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/3916709> >.
- ♦ LI, X. et al. Endocytic pathway mediates refractoriness of insect *Bactrocera dorsalis* to RNA interference. *Sci Rep*, v. 5, p. 8700, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/25731667> >.

- ♦ LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, p. 251364, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22829749> >.
- ♦ MESQUITA, R. D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 48, p. 14936-14941, Dec 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/26627243> >.
- ♦ MONTFORT, W. R.; WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim Biophys Acta*, v. 1482, n. 1-2, p. 110-8, Oct 2000. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11058753> >.
- ♦ NADEAU, N. J. et al. Genomic islands of divergence in hybridizing *Heliconius* butterflies identified by large-scale targeted sequencing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 367, n. 1587, p. 343-53, Feb 2012. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22201164> >.
- ♦ NEIVA, A.; PINTO, C. Dos hemípteros hematofagos do Norte do Brasil com descrição de duas novas espécies. *Brasil Medicina*. 37: 73 76 p. 1923.
- ♦ NERY-GUIMARÃES F, SILVA N, CLAUSELL DT, MELLO AL, RAPONE T, SNELL T, RODRIGUES N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). 1968. *Hospital (Rio J)* 73: 1767-1804.
- ♦ NÓBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 15, n. 4, p. 653-5, Apr 2009. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/19331764> >.
- ♦ O'HARA, T. D. et al. Phylogenomic resolution of the class Ophiuroidea unlocks a global microfossil record. *Curr Biol*, v. 24, n. 16, p. 1874-9, Aug 2014. ISSN 1879-0445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/25065752> >.
- ♦ PAPADOPULOS, A. S. et al. Evaluation of genetic isolation within an island flora reveals unusually widespread local adaptation and supports sympatric speciation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 369, n. 1648, Aug 2014. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24958917> >.
- ♦ PEREIRA, K. S. et al. Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res*, v. 59, p. 63-85, 2010. ISSN 1043-4526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20610174> >.
- ♦ PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot*, v. 72, n. 2, p. 441-6, Feb 2009. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/19350996> >.
- ♦ PEREZ-MOLINA, J. A. et al. EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. *Euro Surveill*, v. 16, n. 37, 2011. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/21944557> >.
- ♦ RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20399979> >.
- ♦ RENAUT, S.; NOLTE, A. W.; BERNATCHEZ, L. Mining transcriptome sequences towards identifying adaptive single nucleotide polymorphisms in lake whitefish species pairs (*Coregonus* spp. Salmonidae). *Mol Ecol*, v. 19 Suppl 1, p. 115-31, Mar 2010. ISSN 1365-294X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20331775> >.
- ♦ REZENDE, V. B. Comparação de transcriptomas por sequenciamento de próxima geração em tecidos de cabeça de duas espécies de moscas-das-frutas, *Anastrepha fraterculus* e *Anastrepha obliqua*. 2014. 82 (Mestrado). Genética, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos- Sp Brasil.

- ♦ RIBEIRO, A. R. et al. Trypanosoma cruzi strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Saude Publica, v. 48, n. 2, p. 295-302, Apr 2014. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24897051> >.
- ♦ RIBEIRO, J. M. et al. An insight into the sialotranscriptome of Triatoma rubida (Hemiptera: Heteroptera). J Med Entomol, v. 49, n. 3, p. 563-72, May 2012. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/22679863> >.
- ♦ RIBEIRO, J. M. et al. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, Rhodnius prolixus. PLoS Negl Trop Dis, v. 8, n. 1, p. e2594, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24416461> >.
- ♦ RIBEIRO, J. M.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. A Deep Insight Into the Sialotranscriptome of the Chagas Disease Vector, Panstrongylus megistus (Hemiptera: Heteroptera). J Med Entomol, v. 52, n. 3, p. 351-8, May 2015. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/26334808> >.
- ♦ RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. Dev Comp Immunol, v. 34, n. 4, p. 377-86, Apr 2010. ISSN 1879-0089. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/19995574> >.
- ♦ RODRIGUES, V. L. et al. Colonization of palm trees by Rhodnius neglectus and household invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 56, n. 3, p. 213-8, 2014 May-Jun 2014. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24878999> >.
- ♦ ROSA, J. A. et al. Description of Rhodnius montenegrensis n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. ZOOTAXA, v. 3478, n. 1175-5334, p. 62 - 76, 2012.
- ♦ RUNDLE, H. D.; NOSIL, P. Ecological speciation
- ♦ Ecology Letters Volume 8, Issue 3. Ecology Letters. 8: 336-352 p. 2005.
- ♦ SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/17891282> >.
- ♦ SCHOFIELD, C. J. Biosystematics and evolution of the Triatominae. Cad Saude Publica, v. 16 Suppl 2, p. 89-92, 2000. ISSN 0102-311X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/11119324>>
- ♦ SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. Adv Parasitol, v. 42, p. 1-27, 1999. ISSN 0065-308X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/10050271> >.
- ♦ SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/19385053> >.
- ♦ SEO, H. et al. Salivary lipocalin is uniquely expressed in the uterine endometrial glands at the time of conceptus implantation and induced by interleukin 1beta in pigs. Biol Reprod, v. 84, n. 2, p. 279-87, Feb 2011. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/20881314> >.
- ♦ SHIEL, B. P. et al. De novo characterisation of the greenlip abalone transcriptome (Haliotis laevigata) with a focus on the heat shock protein 70 (HSP70) family. Mar Biotechnol (NY), v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb 2015. ISSN 1436-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/25079910> >.
- ♦ SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 33, n. 5, p. 351-7, 1991 Sep-Oct 1991. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/1844961> >.
- ♦ SILISTINO-SOUZA, R. et al. Entoepidemiology of Chagas disease in northwest São Paulo and cytogenetic analysis of its main vector, Triatoma sordida (Hemiptera: Triatominae). Genet Mol Res, v. 12, n. 4, p. 5810-9, 2013. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.GOV/pubmed/24301950> >.

- ♦ SILVEIRA, A.; REZENDE, D. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29 (III): 5-28. p. 1994.
- ♦ SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, v. 31, n. 19, p. 3210-2, Oct 2015. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26059717> >.
- ♦ SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> Doença de Chagas Aguda DCA, Brasília - DF, p. notificação de DCA, 2014. Acesso em: 16/09/2014.
- ♦ STEINDEL, M. et al. 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*, v. 60, n. 1, p. 25-32, Jan 2008. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889480> >.
- ♦ TATSUTA, T.; MODEL, K.; LANGER, T. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell*, v. 16, n. 1, p. 248-59, Jan 2005. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525670> >.
- ♦ TODRES, E.; NARDI, J. B.; ROBERTSON, H. M. The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol Biol*, v. 9, n. 6, p. 581-90, Dec 2000. ISSN 0962-1075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122467> >.
- ♦ VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. [Chagas disease in Brazil]. *Cad Saude Publica*, v. 16 Suppl 2, p. 7-12, 2000. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119316> >.
- ♦ VOGT, R. G.; PRESTWICH, G. D.; LERNER, M. R. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J Neurobiol*, v. 22, n. 1, p. 74-84, Jan 1991. ISSN 0022-3034. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010751> >.
- ♦ WATANABE, R. M. et al. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity. *Biochimie*, v. 92, n. 8, p. 933-9, Aug 2010. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363282> >.
- ♦ WHO. World Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis), Geneva, p. World Health Organization, 2015. Acesso em: 16/12/2015.
- ♦ WU, C. I.; TING, C. T. Genes and speciation. *Nat Rev Genet*, v. 5, n. 2, p. 114-22, Feb 2004. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735122> >.
- ♦ XIANJUN, P. et al. De Novo assembly of expressed transcripts and global transcriptomic analysis from seedlings of the paper mulberry (*Broussonetia kazinoki* x *Broussonetia papyifera*). *PLoS One*, v. 9, n. 5, p. e97487, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848504> >.
- ♦ ZENG, Z. B. et al. Genetic architecture of a morphological shape difference between two *Drosophila* species. *Genetics*, v. 154, n. 1, p. 299-310, Jan 2000. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628989> >.

CAPÍTULO II



Short communication

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



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2013

Received in revised form 2 October 2013

Accepted 9 October 2013

Available online xxx

Keywords:

Triatomines

Domiciliation

Antropogenic changes

Vector behavior

ABSTRACT

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

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

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

* Corresponding author. Tel.: +55 1633016943.

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

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

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

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

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



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

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

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

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



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



Fig. 3. Aerial picture of Monte Alto city taken by Google Earth, accessed on October 8, 2012. Distances from palms (PL) and the closest residual forests (F1, F2 and F3): PL 1 – F1: 429.00 m; PL1 – F 2: 464.00 m; PL1 – F 3: 1146.00 m. For PL1 and PL2 definition, go to Figure 2.

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

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

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

Financial Support

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

Acknowledgments

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

References

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

RESEARCH

Open Access

Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy

João Aristeu da Rosa^{1*}, Vagner José Mendonça^{1†}, Sueli Gardim^{1†}, Danila Blanco de Carvalho^{1†}, Jader de Oliveira^{1†}, Juliana Damieli Nascimento^{2†}, Heloisa Pinotti^{3†}, Mara Cristina Pinto^{1†}, Mario Cilense^{4†}, Cleber Galvão^{5†} and José Maria Soares Barata^{6†}

Abstract

Background: Among the vectors of Chagas disease (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), there are eighteen *Rhodnius* species described and some are difficult to identify. The aim of this article is to contribute to the specific identification of fourteen *Rhodnius* spp. through morphological characters of the external female genitalia.

Methods: Female abdomens were cut transversely. The specimens were then prepared for examination by using scanning electron microscopy.

Results: The careful examination of the dorsal, posterior and ventral sides revealed characteristics that allowed the identification of each of the fourteen species.

Conclusion: The use of external female genitalia as characteristics are proposed as a tool for specifically identifying *Rhodnius* species, and an identification key for these species is presented.

Keywords: Triatominae, *Rhodnius*, External female genitalia, Scanning electron microscopy

Background

The Triatominae subfamily is a fundamental link in the epidemiological chain of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is a registered parasite for 24 families and 150 mammalian species as well as humans [1]. Among the 18 genera comprised in the Triatominae subfamily [2,3], *Rhodnius* has been the most difficult to specifically identify according to studies by Neiva and Pinto [4]; Lent *et al.* [5], Bérenger and Sigwalt [6]. *Rhodnius* species can infect by *T. rangeli* too [7].

The first two species described for the genus *Rhodnius* were *R. nasutus* and *R. prolixus*, which were described in 1859 [8]; between that year and 1979, 10 more species were added to this genus [9]. In 2003, 4 species were added to this genus [2] by rehabilitation of *R. amazonicus* [6], description of *R. stali* [5], *R. colombiensis* [10],

and *R. milesi* [11]. The seventeenth and eighteenth species described for this genus were *R. zeledoni* [12] and *R. montenegrinsis* [13].

Based on the literature, identifying such vectors still relies on morphological characteristic descriptions [5,10], even though genotype studies have improved significantly and now contribute to phylogenetic evaluations [14-16].

External female genitalia from the Triatominae subfamily have rarely been used to characterize triatomines [6,17] compared with male genitalia, which have been frequently used as one of the main taxonomic characteristics [5,12,18]. After studying external female genitalia from *Panstrongylus herreri*, *P. megistus*, *R. colombiensis*, *R. prolixus*, *Triatoma infestans* and *T. vitticeps* through scanning electron microscopy (SEM), Rosa *et al.* [19] validated this morphology for taxonomy.

Among species of *Rhodnius* such as *R. brethesi* and *R. pictipes* there is no difficulty in identification [9]. However, other species such, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus*, are widely known as a hard task for a precise discrimination [20,21]. The present study

* Correspondence: joaoaristeu@gmail.com

†Equal contributors

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14 801-902, Araraquara, SP, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

has shown that it is possible to distinguish the four species previously referred to by using characteristics of their female genitalia.

Regarding the epidemiological importance of *Rhodnius* species from Brazil, Gurgel-Gonçalves et al. [22] mentioned that *R. nasutus* and *R. neglectus*, for example, may overlap in geographic distribution in the northeastern Brazil. Then the external female genitalia can help specific distinction of *Rhodnius* spp that occupy the same area.

Given such observations, external female genitalia from 14 *Rhodnius* species were studied herein. This article also offers a key designed to contribute to the taxonomy of the group, and may later work for phylogenetic studies on this subfamily and genus.

Methods

Rhodnius brethesi (N = 2), *R. colombiensis* (N = 5), *R. domesticus* (N = 7), *R. ecuadoriensis* (N = 2), *R. milesi* (N = 3), *R. montenegrensis* (N = 7), *R. nasutus* (N = 4), *R. neglectus* (N = 25), *R. neivai* (N = 2), *R. pallescens* (N = 2), *R. pictipes* (N = 3), *R. prolixus* (N = 15), *R. robustus* (N = 7) and *R. stali* (N = 3) were examined by SEM for this study.

These specimens were deposited or maintained in colonies at the Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Araraquara and Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatómíneos/FIOCRUZ/Rio de Janeiro. They were killed and cut transversely at the beginning of the abdomen. They were then washed, dehydrated using an alcohol-based compound, and oven-dried at 50°C. Next, they were fixed on aluminum supports at the fifth abdominal segment such that the posterior portion was at a 90-degree angle with the support base. Next, metal sputtering was used for 80 seconds at 10 mA. Thereafter, the dorsal, ventral and posterior sides were examined using a Topcon SM 300 scanning electron microscope, Topcon corporation, Hasunuma-cho, Tokyo Itabashi-ku, Japan. The comparative study was performed using images from 87 samples.

Origins for the samples are shown in Tables 1 and 2 summarizes the different characteristics between the 14 *Rhodnius* species. All features herein described as differential characteristics were checked for at least 15 (except for *R. ecuadoriensis* (2), *R. milesi* (3) and *R. neivai* (2)) insects per species by light microscopy (OM) to evaluate if there was intraspecific variability. Characteristics with interspecific variability were discarded from the description.

Results

The dorsal, posterior, and ventral sides of the 14 *Rhodnius* species were analyzed using SEM.

Evaluating the images for the *Rhodnius* species' dorsal sides aided in defining three primary characteristics:

- 1) The line that divides the seventh and eighth segments;
- 2) The shape of the ninth segment; and
- 3) The shape of the tenth segment.

After visualization of the posterior side *Rhodnius* species showed four primary characteristics:

- 1) The line that divides the eighth and ninth segments;
- 2) The line that divides the ninth and tenth segments;
- 3) The shape of the ninth segment; and
- 4) The shape of the tenth segment.

Examining the ventral side showed five primary characteristics:

- 1) The line that divides the seventh segment and the eighth gonocoxites and gonapophyses;
- 2) The shape of the eighth gonocoxites;
- 3) The shape of the eighth gonapophyses;
- 4) The shape of the ninth segment; and
- 5) The shape of the tenth segment.

Based on the characteristics presented by the line that divides the seventh and eighth segments in the dorsal perspective, the species were categorized into three groups:

- a) Species with a curved dividing line: *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. milesi*, *R. nasutus*, *R. neivai*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali* (Figure 1A-H);
- b) Species with a straight dividing line between the seventh and eighth segments: *R. montenegrensis* and *R. robustus* (Figure 1I,J); and
- c) Species with a curved dividing line and an additional downward curve in the middle: *R. brethesi*, *R. colombiensis*, *R. neglectus* and *R. pallescens* (Figure 1K-N).

Based on these criteria, a key was developed to identify the 14 *Rhodnius* species, which are described below.

- 1) The eight species in group **a** were separated by traits observed on the posterior and ventral sides; the results are as follows. The posterior perspective showed that *R. domesticus* has a moon-shaped line that divides the ninth and tenth segments (Figure 2A). The ventral perspective showed that the ninth segment ends slightly below the tenth segment (Figure 3A). *Rhodnius milesi* has lateral transverse 1 + 1 slits on the line that divides the ninth and tenth segments (Figure 2C). The ventral perspective showed that the ninth and tenth segments (Figure 3C) end on the same plane. *R. ecuadoriensis* does not include slits on the tenth posterior segment (Figure 2B). The ventral

Table 1 Species, colony and origin of the triatomines used for the characterization of female genitalia by scanning electron microscopy

Species	Colony	Origin	Initiated
<i>R. brethesi</i>	222	Igarapé Tucunaré, Rio Curiduri, Barcelos, AM, Brazil	20/07/2009
<i>R. colombiensis</i>	050	Tolima, Colômbia	15/02/2001
<i>R. domesticus</i>		Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brazil	
<i>R. ecuadoriensis</i>		Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, RJ, Brazil	
<i>R. milesi</i>		Belém, PA, Brazil	
<i>R. montenegrensis</i>	088	Montenegro, RO, Brazil	29/09/2008
<i>R. nasutus</i>	053	Patú, Messias Targino e Almino Afonso, RN, Brazil	23/05/1983
<i>R. neglectus</i>		Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, RJ, Brazil	
<i>R. neivai</i>		Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, RJ, Brazil	
<i>R. pallescens</i>	070	Barro Colorado, Panamá	14/12/1984
<i>R. pictipes</i>	071	Jacundá, PA, Brazil	23/05/1983
<i>R. prolixus</i>	074	Venezuela	25/05/1983
<i>R. prolixus</i>	075	Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colômbia	15/12/1976
<i>R. prolixus</i>	079	Ortiz Caseiro, Edoguarica, Venezuela	05/09/1999
<i>R. robustus</i>		Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, RJ, Brazil	
<i>R. robustus</i>	083	Instituto de Medicina Tropical - Peru	30/08/1973
<i>R. stali</i>		Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, RJ, Brazil	

perspective showed that eighth gonocoxites ends projected to the ninth segment (Figure 3B).

The tenth segment of *R. neivai* is clearly separated into two lobes by a central slit in the posterior portion (Figure 2E). The ventral perspective showed that the eighth gonocoxites and gonapophyses have a V-shaped depression in the middle, and the tenth segment includes a slit in the middle (Figure 3E).

Rhodnius nasutus has 1 + 1 lateral slits along the posterior end of the tenth segment (Figure 2D). The ventral perspective showed that the tenth segment is semi-circular in shape (Figure 3D).

The posterior perspective showed that the tenth segments in *Rhodnius pictipes* and *R. stali* are rectangular. In *R. pictipes*, a slit was observed at the dividing line between the ninth and tenth segments (Figure 2F). *R. stali* did not include this slit (Figure 2H). The ventral perspective showed that *R. pictipes* includes a ninth segment with wide lateral edges (Figure 1E, 3F), while in *R. stali*, these edges are narrow (Figure 1H, 3H). The posterior perspective for *Rhodnius prolixus* showed that the line dividing the ninth and tenth segments is circular (Figure 2G). On the ventral

side, the posterior 1 + 1 edges for the ninth segment are curved (Figure 3G).

II) The two species that compose group **b** were separated by traits observed in the dorsal, posterior and ventral portion.

The dorsal perspective showed that the seventh segment for *R. montenegrensis* forms 1 + 1 lateral triangular points along the edge of the eighth segment, and the eighth segment is trapezoid-shaped (Figure 1I). In *R. robustus*, the triangular points are smaller, and the eighth segment is rectangular (Figure 1J). From a posterior perspective, it is easier to distinguish between the ninth segment, which is longer in *R. robustus* than *R. montenegrensis* (Figure 2I,J). The ventral perspective showed that the dividing line between the seventh segment and eighth gonocoxites is circular in *R. montenegrensis* and curved in the middle of *R. robustus* (Figure 3I,J).

III) The four species in group **c** were distinguished by traits on the posterior and ventral sides.

The posterior perspective showed that *R. pallescens* includes an oval dividing line between the ninth and tenth segments (Figure 2N).

Table 2 Main characteristics found in the dorsal, posterior, and ventral views of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species

Species	Dorsal view	Posterior view	Ventral view
<i>R. domesticus</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1A)	Moon-shaped line between the 9th and 10th segments (Figure 2A)	9th segment ends slightly below the tenth segment (Figure 3A).
<i>R. ecuadoriensis</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1B)	No transverse 1 + 1 slits on the line between 9th and 10th segments (Figure 2B)	Points of 8th gonocoxite projected onto the 9th segment (Figure 3B)
<i>R. milesi</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1C)	Transverse 1 + 1 slits on the line between 9th and 10th segments (Figure 2C)	9th and 10th segments finish at the same plane (Figure 3C).
<i>R. nasutus</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1D)	Transverse 1 + 1 slits on the line between the 9th and 10th segments (Figure 2D)	Semi-circular 10th segment (Figure 3D)
<i>R. neivai</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1E)	10th segment separated by a slit in 1 + 1 lobes (Figure 2E).	7th segment line with V-shaped depression; 10th segment with slit (Figure 3E).
<i>R. pictipes</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1F)	Rectangular 10th with a slit between 9th and 10th segments (Figure 2F)	9th segment with wide 1 + 1 lateral edges (Figure 3F)
<i>R. prolixus</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1G)	Circular line between 9th and 10th segments (Figure 2G).	Curved 1 + 1 posterior edges of the 9th segment (Figure 3G).
<i>R. stali</i>	Curved line between 7th and 8th segments (Figure 1H)	Rectangular 10th segment with no slit in the middle (Figure 2H)	9th segment with narrow 1 + 1 lateral edges (Figure 3H)
<i>R. montenegrensis</i>	Straight line between 7th and 8th with 1 + 1 triangular points, and a trapezoidal shaped 8th segment (Figure 1I)	Short 9th segment (Figure 2I)	Circular line between 7th segment and 8th gonocoxites (Figure 3I)
<i>R. robustus</i>	Straight line between 7th and 8th with small triangular points and rectangular shaped 8th segment (Figure 1J).	Long 9th segment (Figure 2J)	Line between 7th segment and the 8th gonocoxites curved in middle (Figure 3J)
<i>R. brethesi</i>	Line between 7th and 8th segments that is slightly curved in middle (Figure 1K)	10th segment separated into 1 + 1 lobes by a cavity (Figure 2K)	8th gonocoxites are separated from 8th gonapophyses (Figure 3K)
<i>R. colombiensis</i>	Line between 7th and 8th segments that is slightly curved in middle (Figure 1L)	2 + 2 appendages along line between the 8th and 9th segments (Figure 2L)	8th gonocoxites are not separated from 8th gonapophyses (Figure 3L).
<i>R. neglectus</i>	Line between 7th and 8th segments that is slightly curved in middle (Figure 1M)	Line between 9th and 10th segments that is oval shaped in the anterior portion and which widens on the sides (Figure 2M)	Line of 7th segment is curved on the sides, but not in the middle (Figure 3M).
<i>R. pallescens</i>	Line between 7th and 8th segments that is slightly curved in middle (Figure 1N)	Oval shaped line between the 9th and 10th segments (Figure 2N)	Line of 7th segment has 1 + 1 curves on the sides and is elevated in the middle (Figure 3N)

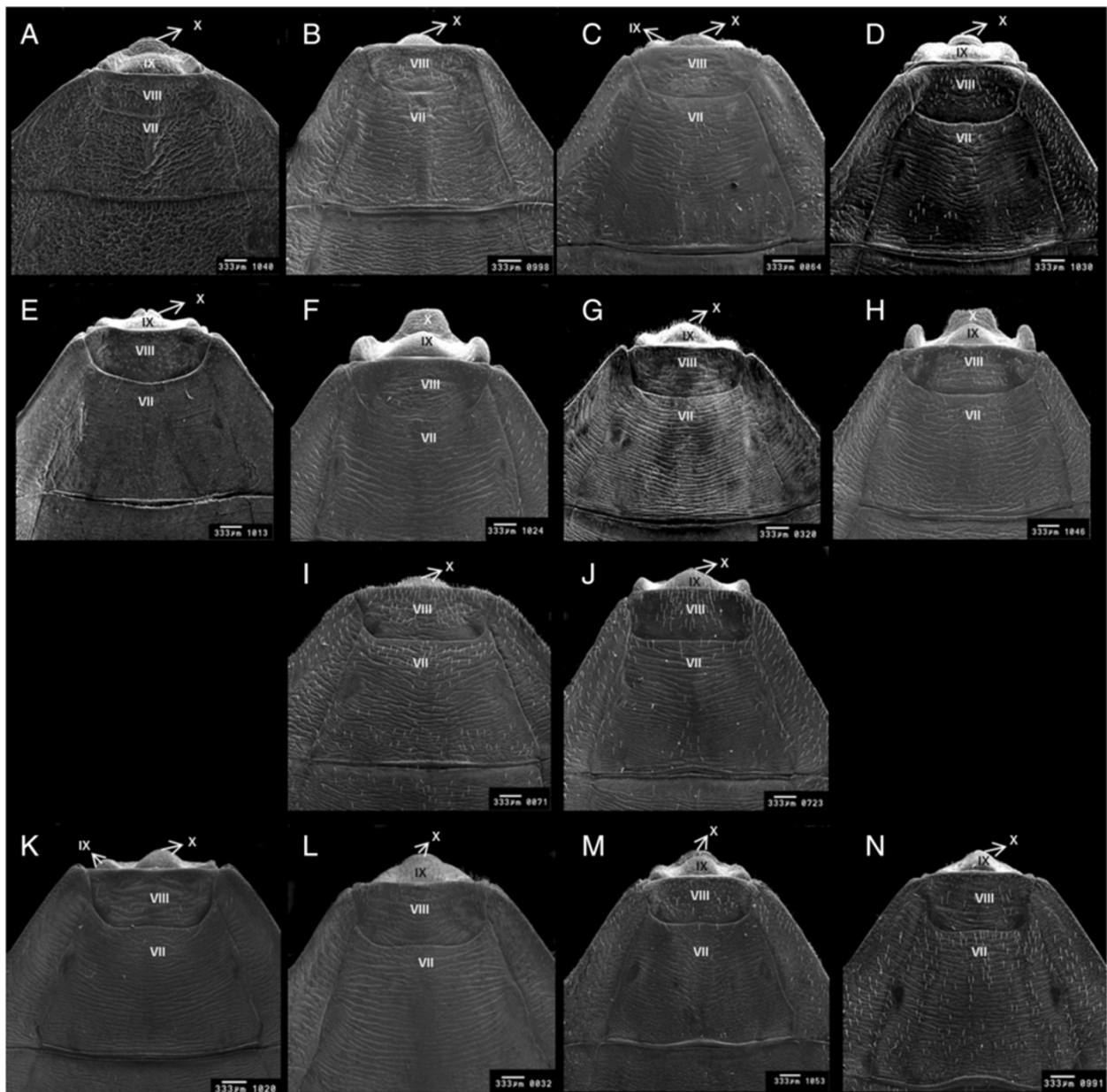


Figure 1 Female external genitalia of fourteen species of *Rhodnius* by scanning electron microscopy, dorsal side. **A:** *Rhodnius domesticus*; **B:** *Rhodnius ecuadoriensis*; **C:** *Rhodnius milesi*; **D:** *Rhodnius nasutus*; **E:** *Rhodnius neivai*; **F:** *Rhodnius pictipes*; **G:** *Rhodnius prolixus*; **H:** *Rhodnius stali*; **I:** *Rhodnius montenegrensis*; **J:** *Rhodnius robustus*; **K:** *Rhodnius brethesi*; **L:** *Rhodnius colombiensis*; **M:** *Rhodnius neglectus* and **N:** *Rhodnius pallescens*; VII, VIII, tergites; IX and X segments.

In *R. neglectus*, this line is also oval-shaped at the beginning, but it widens on the posterior sides (Figure 2M). The ventral perspective showed that *R. pallescens* has a dividing line between the seventh segment and eighth gonocoxites with 1 + 1 lateral curves and a pronounced middle elevation (Figure 3N). *Rhodnius neglectus* includes the same lateral curves but not the middle elevation (Figure 3M).

The posterior perspective showed that the tenth segment of *Rhodnius brethesi* is separated into 1 + 1 lobes by a cavity (Figure 2K), while *R. colombiensis* has 2 + 2 appendages along the dividing line between the eighth and ninth segments (Figure 2L). The ventral perspective showed that *R. brethesi* includes eight gonocoxites that are separate from the eighth gonapophyses (Figure 3K). This separation was not observed in *R. colombiensis* (Figure 3L).

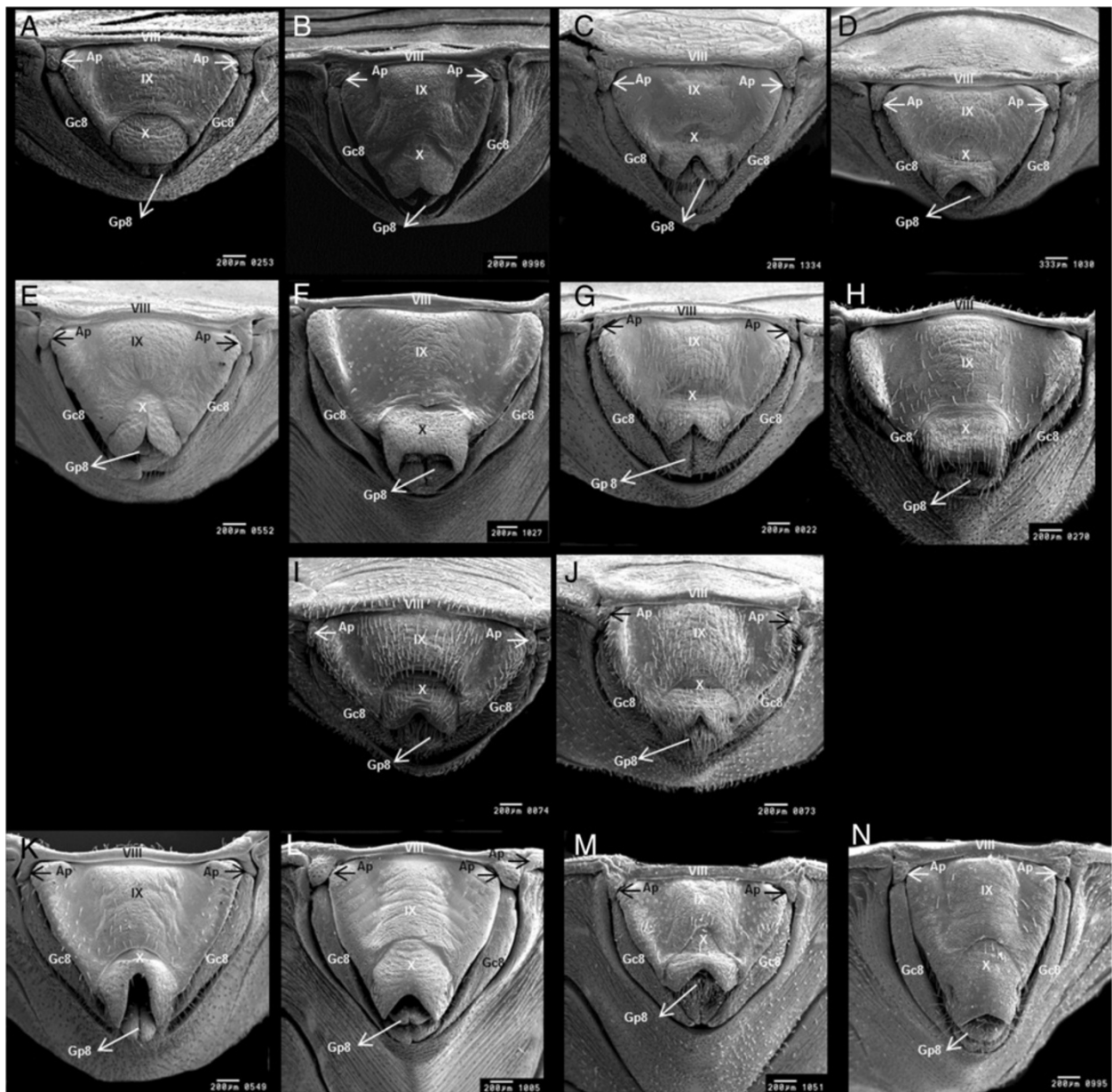


Figure 2 Female external genitalia of fourteen species of *Rhodnius* by scanning electron microscopy, posterior side. **A:** *Rhodnius domesticus*; **B:** *Rhodnius ecuadoriensis*; **C:** *Rhodnius miles*; **D:** *Rhodnius nasutus*; **E:** *Rhodnius neivai*; **F:** *Rhodnius pictipes*; **G:** *Rhodnius prolixus*; **H:** *Rhodnius stali*; **I:** *Rhodnius montenegrensis*; **J:** *Rhodnius robustus*; **K:** *Rhodnius brethesi*; **L:** *Rhodnius colombiensis*; **M:** *Rhodnius neglectus* and **N:** *Rhodnius pallescens*; Ap: appendix; Gc8: gonocoxite 8; Gc9: gonocoxite 9; Gp8: gonapophyse 8; Gp9 gonapophyse 9; VIII tergite; IX and X segments.

The dorsal and ventral side cuticles for the *Rhodnius* species studied had transverse linear grooves, except for the *R. domesticus* cuticle, which comprised irregular grooves (Figure 1A).

Discussion

Even though female genitalia structures can be observed by OM, SEM has several advantages over optical. For this purpose it was possible to view the three dimensional

external shape of a structure (in this case the female genitalia) in the same image. Electron microscopy also allows us to focus on many details of the structure. After checking them by OM, observations described the species specific features, and discarded the polymorphic ones.

Among the 18 *Rhodnius* species [2,12,13], the female external genitalia for *R. amazonicus*, *R. dalessandroi*, *R. paraensis* and *R. zeledoni* were not studied because specimens were unavailable.

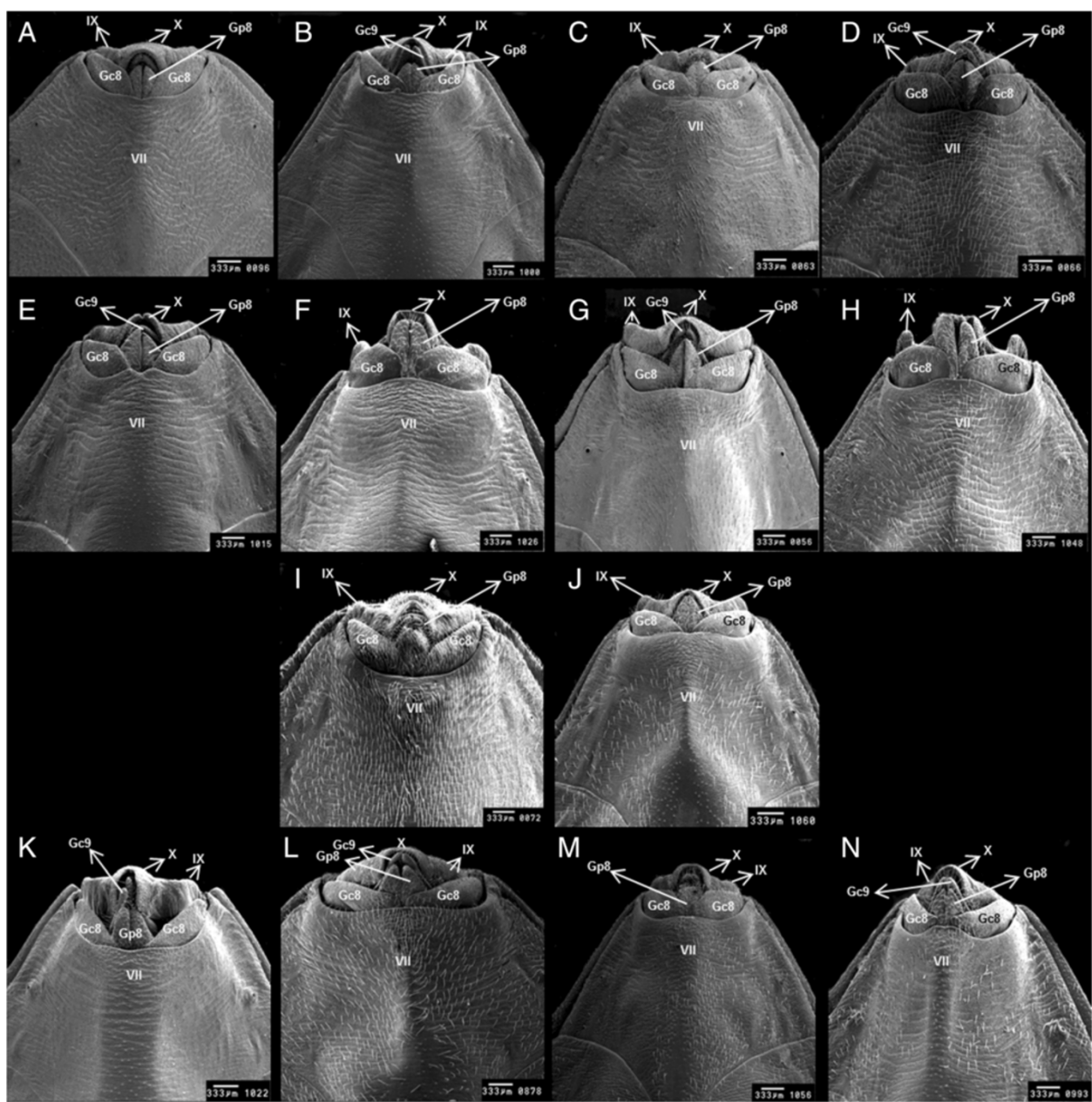


Figure 3 Female external genitalia of fourteen species of *Rhodnius* by scanning electron microscopy, ventral side. **A:** *Rhodnius domesticus*; **B:** *Rhodnius ecuadoriensis*; **C:** *Rhodnius milesi*; **D:** *Rhodnius nasutus*; **E:** *Rhodnius neivai*; **F:** *Rhodnius pictipes*; **G:** *Rhodnius prolixus*; **H:** *Rhodnius stali*; **I:** *Rhodnius montenegrensis*; **J:** *Rhodnius robustus*; **K:** *Rhodnius brethesi*; **L:** *Rhodnius colombiensis*; **M:** *Rhodnius neglectus* and **N:** *Rhodnius pallezensis*; Gc8: gonocoxite 8; Gc9: gonocoxite 9; Gp8: gonapophyse 8; Gp9 gonapophyse 9; VII sternite; IX and X segments.

The relevance of the male genitalia in specific identification of triatomines has been widely used by many authors, including Lent and Jurberg [18] to describe new species. On the other hand the female genitalia, also evaluated by other authors [6,9], has shown itself less valuable due to the hard task of the dissection technique, unlike the male genitalia. The first publication in 2010 using SEM involving

non-dissected insects of non-closely related triatomine species (*P. megistus*, *P. herreri*, *R. prolixus*, *R. colombiensis*, *T. infestans* and *T. vitticeps*), clearly showed that these species can be distinguished by this features [19]. However, in 2012 the validity of this approach was confirmed for closely related species (*R. robustus* and *R. montenegrensis*) [13]. In an unpublished masters thesis, Simone Caldas Neves used the

same approach to distinguish a recently described species (*T. jatai* [23], in the theses called *T. n.sp.*) closely related to *T. costalimai* [24].

Given the difficulties for specific distinctions in the *Rhodnius* species [4,9,12] this study was performed to increase the number of morphological traits that can be used to identify the species in this genus.

For this study, details previously published for external female genitalia traits in four species were reconsidered; the species included were *R. colombiensis*, *R. prolixus* [19], *R. montenegrensis* and *R. robustus* [13].

The key presented and summarized in Table 2 was developed using the most evident traits to identify the 14 *Rhodnius* species using the external female genitalia. Three groups of species (**a**, **b**, and **c**) were formed according to characteristics of the dividing line between the seventh and eighth dorsal segments, which is a visible and perceptible feature (Figure 1A-N). However, given the information verified by the 42 figures, the 14 species can be identified using traits on the dorsal, posterior, and ventral sides as either isolated or associated characteristics.

In the key, *R. montenegrensis* and *R. robustus* separation is based on the dorsal, posterior, and ventral sides (Figures 1I,J, 2I,J, 3I, and J). Though eight species from group **a** and four species from group **c** were characterized based on their posterior and ventral sides, it is important to note that these species also include characteristics on the dorsal side, as with *R. nasutus* and *R. neivai*, which have distinct tenth segment shapes (Figure 1D,E).

Thus, the dorsal side shows that the eighth, ninth and tenth segments are also distinct among the 14 species evaluated (Figure 1A-N).

Based on a posterior perspective, the 14 species can be distinguished by the dimension and shape of the eighth gonocoxites and gonapophyses, the ninth and tenth segments as well as the dividing lines between the eighth and ninth as well as the ninth and tenth segments. This perspective shows that the posterior portion of the tenth segment is concave at the end in 11 species (Figure 2B-E,G,I-N); in *R. pictipes* and *R. stali*, this segment is straight at the end (Figure 2F,H), while in *R. domesticus*, it is semi-circular (Figure 2A).

A ventral perspective shows that the 14 species have distinctive lines at the end of the seventh segment as well as shapes and dimensions for the gonapophyses, the gonocoxites, as well as the ninth and tenth segments. From this perspective, 10 species have a dividing line between the seventh segment and eighth gonocoxites as well as gonapophyses, which is curved at the sides and convex in the middle (Figure 3C-H,J,L-N). In the remaining four species, this line is curved (Figure 3A,B,J, and K). In six species, the eighth gonocoxites meet in a triangular shape (Figure 3A,B,G, and I-K); in the other eight species, this point is non-triangular (Figure 3C-F, H, and

L-N). The eighth gonapophyses are triangular in 12 species (Figure 3A,E,G, and I-N) and rod-shaped in two species (Figure 3F,H).

After combining the results herein on the external female genitalia for these 14 *Rhodnius* species using the five complexes established by Carcavallo *et al.* [20] for this genus, the following factors can be considered.

A comparative analysis of the external female genitalia characteristics for the *R. dalessandroi* complex was impossible because only *R. milesi* specimens were examined.

Rhodnius pictipes and *R. stali*, which compose the *R. pictipes* complex, include traits that join and exclude similar species. These traits include a dividing line between the seventh and eighth segments from the dorsal perspective, rectangular shape of the tenth segment from the posterior perspective, as well as ninth and tenth segment features (Figures 1F,H, 2F, and H). From the ventral perspective, similarities were observed for the line that divides the seventh segment from the eighth gonocoxites and gonapophyses as well as the shape of the eighth gonocoxites and tenth segments (Figures 1F,H, 2F,H, 3F, and H). However, each of these two species maintained distinguishing characteristics. From the dorsal perspective at the intersection between the lines that separate the seventh segment and connectives, *R. pictipes* include 1 + 1 triangles that are not evident in *R. stali*. The dorsal perspective also shows that *R. stali* comprise salient and straight lateral 1 + 1 edges on the ninth segment, while in *R. pictipes*, these edges are wide (Figure 1F,H). From the ventral perspective, this difference is clarified by the shape of the ninth segment end portion, which is wide in *R. pictipes* and straight in *R. stali* (Figure 3F,H).

For the *R. prolixus* complex, which comprises *R. prolixus*, *R. domesticus*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, and, more recently, *R. montenegrensis*, the analyses confirmed that the connecting traits include the shape of the ventral line that divides the seventh segment from the eighth gonocoxites and gonapophyses, except for *R. montenegrensis*. The species include distinguishing traits on the three sides studied. A distinct trait was verified for *R. domesticus*, which was the only species of the 14 that does not include transversely grooved cuticles (Figure 1A). Importantly, *R. neglectus* and *R. prolixus*, which are particularly difficult to distinguish, do have distinguishing characteristics on the dorsal side; the line that separates the seventh and eighth segments is completely curved in *R. prolixus*, while in *R. neglectus*, it is curved on the sides and lightly convex in the middle (Figure 1G,M). On the posterior side, the difference between these two species evident through the dividing line between the ninth and tenth segments, which is circular in *R. prolixus* and oval at the beginning in *R. neglectus* but widens on the posterior sides (Figure 2G,M). The ventral side of *R. prolixus*

shows a laterally expanded ninth segment, which was not observed in *R. neglectus* (Figures 3G,M).

Rhodnius colombiensis, *R. ecuadoriensis* and *R. pallescens*, which comprise the *R. pallescens* complex, include a set of ninth and tenth segments on the posterior side that form an isosceles triangle (Figure 2B,L, and N). This configuration clearly connects these three species. The distinction between such species is particularly evident on the ventral side, where the posterior portion of the eighth gonocoxites and gonapophyses is projected on the ninth segment in *R. ecuadoriensis*; however, the gonocoxite is not projected in *R. colombiensis*. This structure has a different shape in the two species (Figure 3B,L). In *R. pallescens*, the dividing line that separates the seventh segment from the eighth gonocoxites and gonapophyses is elevated in the middle; the elongated shape of the ninth and tenth segments also distinguishes this species from *R. colombiensis* and *R. ecuadoriensis* (Figure 3N,L, and B).

The studies performed herein facilitate identification and descriptions for three distinguishing features on the dorsal side, four features on the posterior side and five features on the ventral side of the external female genitalia in the 14 *Rhodnius* species, which distinguish the species. Using such findings, a key was developed to aid in distinguishing the 14 *Rhodnius* species. There is no record in the literature for intraspecific polymorphism for the female genitalia; however, this characteristic has not been widely explored. Given that, we do not discard the possibility of intraspecific variation for field populations and some of the features elected shall be confirmed with a much larger sample of field material. Therefore, we consider the possibility of further adjustments in the key. On the other hand, all descriptive studies in the morphology field also have this limitation. For triatomines, morphological variations, not described before, were detected for *Rhodnius nasutus* in Ceara [25], and *Triatoma rubrovaria* in Rio Grande do Sul [26].

The morphological traits for the external female genitalia validate four of the five complexes proposed by Carcavallo *et al.* [20] for the genus *Rhodnius*. They also specifically distinguish the species in the complexes. The fifth complex proposed by Carcavallo *et al.* [20], which also includes the species *R. milesi* was impossible to evaluate due to a lack of *R. dalessandroi* specimens.

It is important to highlight that the results herein corroborate the observations in Rosa *et al.* [19], which considered these traits for *P. herreri*, *P. megistus*, *R. colombiensis*, *R. prolixus*, *T. infestans* and *T. vitticeps* and validated the taxonomy. However, the study herein is a continuation of the study on the posterior ventral abdominal segments for the female nymphs in the fifth nymphal stage from six Triatominae species in Rosa *et al.* [27], wherein specifically distinguishing characteristics were identified.

Finally, it will necessary to clarify whether the features of the female genitalia described by SEM may also be observed through OM by non-experts. In addition, given the possible polymorphism for field populations we recommend: (i) first using to the traditional classification and then (ii) make use of this study for the specific confirmation.

Conclusions

Examination by SEM of the dorsal, posterior and ventral surfaces of the female external genitalia of 14 species of *Rhodnius* enabled the identification.

Through OM was also possible to identify the 14 species of *Rhodnius*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

Conceived the study: JAR, SG, DBC, JO, JDN and HP. Prepared samples: VJM, SG, DBC, JO, JDN and HP. Analysed data: JAR, CG and JMSB. Interpreted data: JAR, VJM, SG, DBC, JO, JDN, HP, MCP, MC, CG and JMSB. Wrote the manuscript: JAR, VJM, SG, DBC, JO, JDN, HP, MCP, MC, CG and JMSB. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Triatomine and Chagas Disease Epidemiology Laboratory and the René Rachou Research Center (CPQRR) in Fiocruz, Minas Gerais, Brazil, which supplied the *R. domesticus* specimens, as well as Dr. Sebastião Aldo da Silva Valente from Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil, who provided the *R. milesi* specimens.

Financial support

The CAPES organization (Ministry of Education, Brazilian Government, Brazil), process number 23038.005285/2011-12, and FAPESP (Sao Paulo Research Foundation, Sao Paulo, Brazil), process numbers 2010/20 333-6, 50 355-1, and 15 386-3.

Author details

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14 801-902, Araraquara, SP, Brasil. ²Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Av. Prof. Francisco Degni, 55, 14 800-060 Araraquara, SP, Brasil. ³Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. ⁴Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, Araraquara, SP, Brasil. ⁵Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ⁶Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Received: 25 September 2013 Accepted: 27 December 2013

Published: 9 January 2014

References

1. OMS: *Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico, 17-20 de abril de 2005*. Argentina: Buenos Aires; 2007. Actualizado en julio de 2007. http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf. Access: dez, 30, 2013.
2. Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J: *A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes*. *Zootaxa* 2003, **202**:1-36.
3. 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* 2004, **670**:1–12.
- Neiva A, Pinto C: Estado actual dos conhecimentos sobre o gênero *Rhodnius* Stål, com a descrição de uma nova espécie. *Bras Med* 1923, **37**:20–24.
 - Lent H, Jurberg J, Galvão C: *Rhodnius stali* sp. n., afim de *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993, **88**:605–614.
 - Bérenger JM, Pluot-Sigwalt D: *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973, Bona Species, Close to *R. pictipes* Stål, 1872 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**(1):73–77.
 - Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P: Parasite-mediated interactions within insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. *Parasite Vector* 2012, **5**:105–111.
 - Stål C: Monographie der gattung conorhinus und verwandten. *BerlinerEnt Zeitschr* 1859, **3**:99–117.
 - Lent H, Wygodzinsky P: Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979, **163**:123–520.
 - Mejia JM, Galvão C, Jurberg J: *Rhodnius colombiensis* sp.n. da Colômbia, com quadros comparativos entre as estruturas fálcias do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 1999, **6**(6):601–617.
 - Valente VC, Valente SAS, Carcavallo RU, Rocha DS, Galvão C, Jurberg J: Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stål, do Estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 2001, **8**:65–80.
 - Jurberg J, Rocha DS, Galvão C: *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotropica* 2009, **9**(1):123–128.
 - Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira Filho JCR, Carvalho EOC, Camargo LMA, Oliveira J, Nascimento JD, Cilense M, Almeida CE: Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 2012, **3478**:62–76.
 - Naegele MP, Costa PI, Rosa JA: Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. *Med Vet Entomol* 2006, **20**:353–357.
 - Mendonça VJ, Silva MTA, Araújo RF, Martins J Jr, Bacci M Jr, Almeida CE, Costa J, Graminha MAS, Cicarelli RMB, Rosa JA: Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**(5):858–864.
 - Gardim S, Rocha CS, Almeida CE, Takiya DM, Silva MTA, Ambrósio DL, Cicarelli RMB, Rosa JA: Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in central-western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2013, **89**(4):766–774.
 - Almeida FB, Santos EI, Sposina G: Triatomíneos da amazonia III. *Acta Amazon* 1973, **3**(2):43–66.
 - Lent H, Jurberg J: O gênero *Rhodnius stali*, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Bras Biol* 1969, **29**:487–560.
 - Rosa JA, Mendonça VJ, Rocha CS, Gardim S, Cilense M: Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, **105**:286–292.
 - Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C: Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vect* 2000, **7**(1):1–99.
 - Barata JMS: Aspectos morfológicos de ovos de Triatominae II- Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saude Publica* 1981, **15**(5):490–542.
 - Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT: Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med* 2012, **2012**:1–15.
 - Gonçalves TCM, Teves-Neves SC, dos Santos-Mallet JR, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM: *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, **108**(4):429–437.
 - Teves-Neves SC: Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil. Instituto Oswaldo Cruz; 2012. <http://arcai.cict.fiocruz.br/handle/cict/6922>. Access: nov 10. 2013.
 - Dias FBS, Paula AS, Belisário CJ, Lorenzo MG, Bezerra CM, Harry M, Diotaiuti L: Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infect Genet Evol* 2011, **11**:869–877.
 - Almeida CE, Pacheco RS, 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* 2002, **97**(6):829–834.
 - Rosa JA, Barata JMS, Santos JLF, Belda Neto FM: Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995, **87**(2):257–264.

doi:10.1186/1756-3305-7-17

Cite this article as: da Rosa et al.: Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

