

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR)
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia

LUCAS ABRANTES DA SILVA

Estudo morfológico, morfométrico e molecular de cinco espécies do subcomplexo
Triatoma rubrovaria (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Araraquara/SP

2018

LUCAS ABRANTES DA SILVA

**Estudo morfológico, morfométrico e molecular de cinco espécies do subcomplexo
Triatoma rubrovaria (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

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

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara/SP

2018

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Lucas Abrantes da
Estudo morfológico, morfométrico e molecular de cinco espécies do subcomplexo
Triatoma rubrovaria (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Lucas Abrantes da Silva. –
Araraquara, 2018.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Parasitologia, subárea
Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. *Triatoma*. 2. Morfologia. 3. Morfometria. 4. Marcadores moleculares. 5. Filogenia.
I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo, morfológico, morfométrico e molecular de cinco espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae Triatominae):

AUTOR: LUCAS ABRANTES DA SILVA


ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: PARASITOLOGIA pela Comissão Examinadora:



~~Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA~~

~~Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP~~



Dr. CLEBER GALVÃO FERREIRA

Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos da / Fundação Oswaldo Cruz



Prof. Dr. CARLOS EDUARDO ALMEIDA

Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP

Araraquara, 29 de janeiro de 2018

O dinheiro faz homens ricos,
o conhecimento faz homens
sábios e a humildade faz
grandes homens.

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho
a minha Mãe, Marlene e ao meu pai, Gabriel (in memoriam).

Agradecimentos

Primeiro, agradeço a Deus por estar presente nos momentos difíceis, dando força e saúde para superar as dificuldades.

Ao meu pai Gabriel da Silva (in memoriam), que sempre me proporcionou momentos de paz e alegria e meus irmãos e minha mãe. Agradeço por lutar até o fim de sua vida para nos proporcionar conforto e transmitir sua perseverança e simplicidade.

À minha mãe Marlene Abrantes da Silva, guerreira que sempre incentivou os filhos a estudarem, direcionando-nos sempre para um caminho de honestidade e bondade.

À minha irmã Gisélia Abrantes da Silva, pela amizade e por sempre acreditar nos meus sonhos e por sempre trazer palavras de conforto em dias difíceis além do amor que tem com seus filhos e companheiro.

Ao companheiro da minha irmã, Julio Cesar pela amizade e por ser um ótimo padrasto para meus sobrinhos e um ótimo pai para meu sobrinho Samuel e por ser um ótimo companheiro para minha irmã.

Ao meu irmão Rodrigo Abrantes da Silva, por ter sido severo quando necessário, me direcionando sempre para o caminho do bem, também agradeço a amizade e todo amor que temos um pelo outro, além de seu amor para seus filhos e companheira.

A companheira do meu irmão, Miriã Siqueira pela amizade e por dedicar seu tempo à família e por transmitir todo seu amor para seus filhos e para seu companheiro.

Agradeço a minha grande família, Tios e Tias e Primos por toda amizade e companheirismo.

Aos meus sobrinhos, Beatriz, Heloisa, Giovana, Miguel, Isabela e Victor. Bênçãos que me alegram a cada dia, dedico então todo o meu amor para eles. E ao

menor membro da família, meu sobrinho Samuel de 8 meses de vida que nos enche de amor e alegria.

Aos meus padrinhos Manoel e Zesinha, que sempre estiveram ao meu lado e da minha família independente se eram momentos bons ou ruins, sempre nos acolheram com palavras de amor e paz. E agradeço aos filhos dos meus padrinhos, são meus amigos de infância, Anderson, Emerson e Ilana todos estão guardados no meu coração.

Aos amigos que admiro, pois me acolheram na cidade de Araraquara no ano de 2005, com os quais mantenho amizade até os dias de hoje, então agradeço ao, Daniel Dinois, Dário, Danilo Veltri, Diogo Candido, Edi Holla, Ricardo Rodrigues e Thiago Alencar.

Ao Professor, Dr. João Aristeu da Rosa, agradeço por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e por ser uma pessoa incrível, pois além de ser um excelente orientador, acima de tudo é humano, sempre transmitindo muita alegria e amor para todos os seus orientandos e amigos.

A Prof. Dra Mara Cristina Pinto do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Araraquara. Com muita satisfação agradeço a professora, Mara por ser uma pessoa, assim como professor João Aristeu, humana, paciente e muito amorosa com todos os seus alunos além de tirar inúmeras dúvidas quando precisei e é uma excelente profissional.

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto-SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (IBILCE/UNESP), por participar da minha qualificação e por todas as colaborações tornando minha dissertação mais robusta. Além de inúmeras colaborações com o professor João Aristeu da Rosa e alunos.

Ao Prof. Dr. Fernando Pavan do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Araraquara. Por ter cedido o

laboratório, além de participar do meu exame de qualificação e por contribuir muito para a dissertação final.

Ao Dr. Carlos Eduardo Almeida da Instituição: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Departamento: Biologia Animal, IB, Campus Universitário Zeferino Vaz. agradeço por aceitar o convite para participar do meu exame de defesa de mestrado e por muitas colaborações com grupo do professor João Aristeu.

Ao Prof. Dr Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. agradeço por aceitar o convite para participar do meu exame de defesa de mestrado e por muitas colaborações com grupo do professor João Aristeu e amizade.

Ao Prof. Marcos Obara da Universidade de Brasília/UnB, pela amizade e incentivos para seguir em frente com um doutorado e por fornecer os espécimes de *T. circummaculata* que foram necessários para o desenvolvimento da minha dissertação.

A todos os amigos do laboratório de Parasitologia que conquistei durante o período de mestrado e outros que já havia conhecido durante a graduação. Então agradeço pelo companherismo, ajuda e dicas durante o desenvolvimento de minha dissertação de mestrado à Aline Rimoldi, Eder Souza, Dennys Ortiz, Flavia Benini, Jader Oliveira, Juliana Damieli, Rafael Della Santa, Rossana Falcone, Sueli Gardim, Tiago Belintani, Thais, Vicente Machado e Wanderson Oliveira. Além das minhas amigas Milca e Graciele do Laboratório de Biologia Molecular e Análises Clínicas Leandro Costa e Kelly Imamura pela disposição e por ter fornecido dicas importantes com relação a à biologia molecular.

Ao meu amigo Mário de Oliveira Brito, uma amizade que conquistei durante as coletas de triatomíneos realizadas no ano de 2016, no estado do Rio Grande do Sul, é uma amizade que levarei por toda vida. À sua esposa Izabel e sua sogra Dolita, pessoas maravilhosas que me acolheram no município de Caçapava do Sul.

A Cleonara Bedin da Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde Centro Estadual de Vigilância em Saúde-SES, por todo suporte durante as coletas de triatomíneos realizadas no estado do Rio Grande do Sul.

A Fernanda de Mello: Coordenadora do Núcleo de Triatomíneo-Reservatórios e Vetores/ IPB-LACEN/FEPPS/SES – RS, por instruir quanto aos pontos de coleta de triatomíneos nos sete municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Agradeço aos funcionários de pós- graduação e de seção técnica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus UNESP- Araraquara.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por financiar minha Bolsa de estudo.

RESUMO

O subcomplexo *Triatoma rubrovaria* é constituído por: *T. carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, que podem veicular *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. A partir de triatomíneos coletados no estado do Rio Grande do Sul e de colônias mantidas em laboratório, foram estudados caracteres morfológicos, morfométricos e moleculares de *T. carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*. Nos estudos morfológicos foram examinados caracteres da cabeça, tórax dorsal/ventral e abdômen. Por meio de microscopia eletrônica de varredura foram observados 17 caracteres que contribuíram para a identificação das cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*. Doze caracteres da cabeça, um do tórax e um do abdômen foram estudados por morfometria e avaliados por análises estatísticas. As análises morfométricas possibilitaram diferenciar as cinco espécies, entretanto *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* mostraram-se distintas por apenas três parâmetros morfométricos. Por microscopia óptica foram desenvolvidos estudos por morfometria geométrica de cabeças e asas. Os estudos moleculares foram realizados por meio de sequenciamento e análise dos genes mitocondriais COI, Cytb, 16S e indicaram que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* são espécies afins e estão inseridas no subcomplexo *T. rubrovaria* juntamente com *T. carcavalloei*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*. Em *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* os genes mitocondriais COI e 16S são mais distantes evolutivamente de *T. carcavalloei* e *T. klugi*, enquanto que para o gene Cytb a maior distância evolutiva é em relação a *T. carcavalloei*. Os resultados obtidos mostram que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* são espécies afins e diferem morfológicamente quanto ao pronoto, escutelo, sulco estridulatório e genitália externa feminina, assim como nas análises moleculares com os três genes mitocondriais.

Palavras-chave: *Triatoma*. Morfologia. Morfometria. Marcadores moleculares. Filogenia.

ABSTRACT

The subcomplex *Triatoma rubrovaria* is composed for *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai*, *T. pintodiasi* and *T. rubrovaria*, which can carry *T. cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease. From triatomines collected in the state of Rio Grande do Sul and colonies kept in the laboratory, were studied morphologic, morphometric and molecular characters of *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* and *T. rubrovaria*. In the morphologic studies, head, ventral / dorsal thorax and abdomen. By means of scanning electron microscopy 17 characters were observed that contributed to the identification of the five species of the *T. rubrovaria* subcomplex. Twelve characters of the head, one of the thorax and one of the abdomen were studied by morphometric and evaluated by statistics analysis. The morphometric analysis allowed to differentiate the five species, however *T. circummaculata* and *T. pintodiasi* were distinguished by only three morphometric parameters. By optical microscopy studies were developed by geometric morphometric of heads and wings. Molecular studies were performed out by means of amplification of the mitochondrial genes COI, Cytb, 16S and indicated that *T. circummaculata* and *T. pintodiasi* are similar species and are inserted in the subcomplex *T. rubrovaria* together with *T. carcavalloi*, *T. klugi* and *T. rubrovaria*. The mitochondrial genes COI and 16S in *T. circummaculata* and *T. pintodiasi* are more evolutionarily distant from *T. carcavalloi* and *T. klugi*, whereas no mitochondrial Cytb gene a greater evolutionary distance is in relation to *T. carcavalloi*. The results obtained show that *T. circummaculata* and *T. pintodiasi* are similar species and morphologically differ in pronotum, scutellum, estridulatory sulcus and female external genitalia, as well as in the molecular analyzes with the three mitochondrial genes.

Keywords: *Triatoma*. Morphologic. Morphometric. Molecular markers. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 2. Espécies do subcomplexo <i>T. rubrovaria</i> utilizadas no estudo.....	29
Figura 3. Ambientes onde foram realizadas as coletas por busca ativa durante o dia, no estado do Rio Grande do Sul.	31
Figura 4. Fluxograma do estudo morfológico.	33
Figura 5. Parâmetros da cabeça e probóscide utilizados para o estudo morfométrico de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	34
Figura 6. Parâmetros do toráx e abdômen utilizados para estudo morfométrico de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	35
Figura 7. Detalhe da cabeça de adulto fêmea de <i>T. rubrovaria</i> com marcação dos sete pontos de referência (landmarks) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software CLICK 99.	36
Figura 8. Detalhe da asa esquerda de adulto fêmea de <i>T. circummaculata</i> com marcação dos sete pontos de referência (landmarks) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software CLICK 99.	37
Figura 9. Caracteres morfológicos da cabeça de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	42
Figura 10. Caracteres morfológicos do pronoto de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	44
Figura 11. Caracteres morfológicos do escutelo de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	45

Figura 12. Sulco estridulatório de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	46
Figura 13. Caracteres morfológicos da genitália externa feminina por vista dorsal de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	47
Figura 14. Caracteres morfológicos da genitália externa feminina por vista posterior de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i>	48
Figura 15. Caracteres morfológicos da genitália externa feminina por vista ventral de <i>T. circummaculata</i> , <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	49
Figura 16. Variação do tamanho médio do centroide das cabeças de fêmeas de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> , <i>T. rubrovaria</i> e <i>T. petrochiae</i> .	58
Figura 17. Variação do tamanho médio do centroide das cabeças de machos de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> , <i>T. rubrovaria</i> e <i>T. petrochiae</i> .	59
Figura 18. Variação do tamanho médio do centroide das asas de fêmeas de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> , <i>T. rubrovaria</i> e <i>T. petrochiae</i> .	60
Figura 19. Variação do tamanho médio do centroide das asas de machos de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> , <i>T. rubrovaria</i> e <i>T. petrochiae</i> .	60
Figura 20. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das cabeças de fêmeas (A) e machos (B) em relação à relação análise dos componentes principais. Os eixos representam os componentes 1 e 2.....	62
Figura 21. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das asas de fêmeas (A) e machos (B) em relação à relação análise dos componentes principais. Os eixos representam os componentes 1 e 2.	63
Figura 22. Dendograma para cabeças de fêmeas e machos de <i>Triatoma carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	64

Figura 23. Dendograma para asas de fêmeas (gráfico A) e machos (gráfico B) de <i>Triatoma carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	65
Figura 24. Gel de DNA genômico de <i>Triatoma carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> e <i>T. pintodiasi</i>	66
Figura 25. Amplificações dos fragmentos COI, CytB e 16S detalhe dos géis de agarose de <i>T. carcavallo</i>	67
Figura 26. Alinhamento das sequencias consenso do fragmento COI do DNA mitocondrial (587 pb).....	68
Figura 27. Alinhamento das sequencias consenso do fragmento Cytb do DNA mitocondrial (692 pb).....	69
Figura 28. Alinhamento das sequencias consenso do fragmento 16S (542 pb).....	70
Figura 29. Dendograma filogenético baseado no sequenciamento do fragmento de gene COI do DNA mitocondrial de 12 espécies de Triatominae.....	71
Figura 30. Dendograma filogenético baseado no sequenciamento do fragmento de gene Cytb de 12 espécies de Triatominae.....	72
Figura 31. Dendograma filogenético baseado no sequenciamento do fragmento de gene 16S de 13 espécies de Triatominae.....	73
Figura 32. Dendograma representativo da análise bayesina concatenada referente ao sequenciamento dos genes 16S, COI e Cytb.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécimes mantidas no insetário, de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP- Araraquara, identificados com código CTA (Colônia de Triatominae de Araraquara).....	30
Tabela 2. Triatomíneos coletados no estado do Rio Grande do Sul.....	32
Tabela 3. Número de triatomíneos utilizados para realização da morfometria geométrica.	35
Tabela 4. Iniciadores moleculares utilizados para amplificar o DNA de <i>T. carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	38
Tabela 5. Estudo estatístico de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de <i>T. carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	52
Tabela 6. Análises de Variância ($P < 0.05$) de fêmeas de <i>Triatoma carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	53
Tabela 7. Estudo estatístico de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdômen de machos de <i>T. carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	56
Tabela 8. Análises de Variância ($P < 0.05$) de machos de <i>Triatoma carcavallo</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	58
Tabela 9. Código das sequências disponíveis no <i>Genbank</i> utilizadas na reconstrução filogenética.....	67

Lista de abreviaturas e siglas

% - porcentagem.

10 - mA milliamps

16S - genes de subunidades ribossomais do mtDNA.

°C - graus celsius

A - nucleotídeo adenina

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

C - nucleotídeo citocina

CLIC_99 - Collection of Landmarks for Identification and Characterization

COI - citocromo oxidase1 do mtDNA.

CP1 e CP2 – Componentes principais.

CTA - Colônia de Triatominae de Araraquara.

Cytb - citocromo b do mtDNA.

DNA - ácido desoxirribonucleico.

DNAg - DNA genômico.

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

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

F – sequencia forward.

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

G - nucleotídeo guanina

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

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

Iq - Instituto de química

Kb - kilobase (1000 bases).

M - molar.

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura.

mL - mililitro.

mM - milimolar.

m- molar

mtDNA- ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

NCBI- National Center Biotechnology Information

nDNA - DNA nuclear.

WHO - World Health Organization

PCR - Polymerase Chain Reaction.

pH - Potencial Hidrogeniônico

pb - pares de base.

RNAse - Ribonuclease

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

R - sequencia reverse.

rpm - Rotações por minuto.

SDS - Dodecil sulfato de sódio.

TE/TAE - solução tampão.

T- nucleotídeo timina

Tris - HCl - Tris-Ácido clorídrico.

V -volts

U - unidade.

μL - microlitro

SUMÁRIO

1.1.	Doença de Chagas.....	20
1.2.	Vetores da doença de Chagas	22
1.3.	Importância epidemiológica e aspectos taxonômicos das espécies de triatomíneos do Rio Grande do Sul.....	22
1.4.	<i>Triatoma carcavallo</i> Jurberg et al., 1998.....	23
1.5.	<i>Triatoma circummaculata</i> (Stal, 1859).....	23
1.6.	<i>Triatoma klugi</i> Jurberg et al., 2001.....	24
1.7.	<i>Triatoma pintodiasi</i> Jurberg et al., 2013.....	24
1.8.	<i>Triatoma rubrovaria</i> (Blanchard, 1843).....	25
1.9.	Subcomplexo <i>Triatoma rubrovaria</i>	25
2.	OBJETIVOS.....	28
2.1.	Objetivo Geral	28
2.2.	Objetivos específicos	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1.	Procedência dos triatomíneos utilizados no desenvolvimento do estudo	29
3.2.	Estudo morfológico	33
3.3.	Análise morfométrica	33
3.4.	Morfometria geométrica	35
3.5.	Extração do DNA genômico.....	37
3.6.	Amplificação dos fragmentos por (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR)	38
3.7.	Purificação e sequenciamento do DNA amplificado	40
3.8.	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – BLAST	40
3.9.	Análise filogenética	40

4.	RESULTADOS:	42
4.1.	Estudo morfológico por microscopia eletrônica de varredura	42
4.1.1.	Cabeça:	42
4.1.2.	Tórax.....	43
4.1.3	Pronoto:.....	43
4.1.4	Escutelo:	44
4.1.5	Sulco Estridulatório	45
4.1.6	Abdômen.....	46
4.1.7.	Genitália externa feminina por vista dorsal	46
4.1.8.	Genitália externa feminina por vista posterior.....	47
4.1.9.	Genitália externa feminina por vista ventral.....	48
4.2.	Estudo morfométrico	50
4.2.1	Estudos morfométricos de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	50
4.2.2	Análises de variância entre as espécies <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	50
4.2.3	Estudos morfométricos de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de machos de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	54
4.2.4	Análises de variância entre as espécies <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	54
4.3	Morfometria geométrica	58
4.3.1	Variabilidade de tamanho das cabeças e asas de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> , <i>T. rubrovaria</i> e <i>T. petrochiae</i>	58
4.3.2	Variabilidades de forma entre cabeças e asas de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	61

4.3.3	Dendogramas de similaridade morfométrica	64
4.4.	Estudos moleculares	66
4.4.1.	DNA genômico de <i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummacula</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. pintodiasi</i> e <i>T. rubrovaria</i>	66
4.4.2.	Amplificação e sequenciamento dos fragmentos de gene	66
4.4.3	Alinhamento das sequências consensos dos fragmentos COI, Cytb e 16S.....	67
4.4.4	Dendogramas gerados com alinhamento das sequencias consensos	71
4.4.5	Análise Bayesiana.....	73
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES:.....	81
	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose, que tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* e foi descrita em 1909 por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz. As contribuições de Carlos Chagas determinaram um impacto científico muito significativo, pois um mesmo pesquisador descreveu o agente etiológico, o vetor, os reservatórios silvestres, a doença humana e, conseqüentemente, o diagnóstico parasitológico (CHAGAS, 1909).

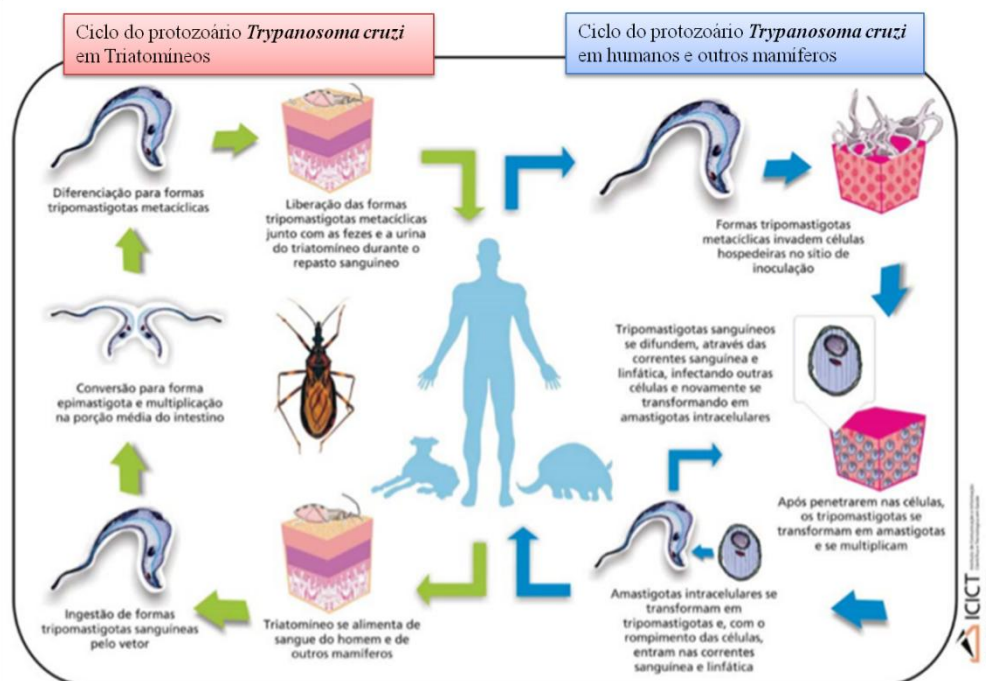
A doença de Chagas, descrita inicialmente como tripanossomíase americana, ocorre principalmente em 21 países da América Latina com caráter endêmico, devido à distribuição do vetor e dos reservatórios, que são mamíferos silvestres (VINHAES; DIAS, 2000; COURA; DIAS, 2009; WHO, 2017). Devido ao aumento da migração nos últimos anos, a doença de Chagas se expandiu para diversos países como os Estados Unidos da América, Canadá e vários países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. (ROCHA; TEIXEIRA; RIBEIRO, 2007; WHO, 2017). Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas com a doença de Chagas por todo o mundo (WHO, 2017).

A principal via de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas ao homem é por meio dos triatomíneos, conhecidos popularmente no Brasil como inseto barbeiro. A transmissão vetorial corresponde a 80% dos casos da doença de Chagas (ARAS et al., 2003). Essa transmissão vetorial ocorre pelo contato com as fezes eliminadas pelos triatomíneos infectados com *T. cruzi* no ato da picada (WHO, 2017). Porém, existem outras formas de transmissão, como, a transfusão sanguínea, a transmissão congênita, por acidente laboratorial, transplante e a via oral, (DIAS, 2007; COURA, 2014; 2017). Contudo a transmissão oral tem importância epidemiológica, principalmente na região Norte devido à ingestão de açaí contaminado com *T. cruzi* (NÓBREGA et al., 2009). Na região Sul em Santa Catarina no ano de 2005, 24 pessoas foram contaminadas ao ingerir caldo de cana, em uma única praça de alimentação, no município de Navegantes, das quais três morreram (STEINDEL et al., 2008).

Os triatomíneos ao se alimentarem de mamíferos infectados com *T. cruzi* ingerem as formas tripomastigotas sanguíneas, ao chegar à porção média do intestino os parasitos se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam, após algum tempo os parasitos encontrando condições ideais migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. O triatomíneo quando defeca libera essas

formas e o parasito ao encontrar uma porta de entrada cai na corrente sanguínea e então as tripomastigotas metacíclicas penetram as células de defesa, no caso os macrófagos. Os tripomastigotas já dentro da célula hospedeira se diferenciam em amastigotas e se multiplicam, nessa fase é que se inicia o processo patogênico. Após intensa multiplicação, as formas amastigotas se diferenciam para tripomastigotas, a seguir rompe-se a membrana do macrófago. Formas tripomastigotas invadem outros macrófagos e outras circulam na corrente sanguínea. Desse modo, o triatomíneo ao sugar o hospedeiro que conta com as formas tripomastigotas no sangue se infecta e o ciclo se repete (ARGOLO et al., 2008).

Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*



Ciclo de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Vinício Ribeiro ICICT/ FioCruz

Argolo et al., (2008)

A doença de Chagas pode se apresentar sob três fases: aguda, indeterminada e crônica. Na fase aguda, que pode perdurar por dois meses após a infecção, as manifestações clínicas podem variar desde os casos assintomáticos até aqueles com manifestações fracas apresentando apenas febre e podendo passar despercebida. Na fase aguda também podem ser observados outros sintomas como diarreia e vômitos quando o trato digestivo é atingido. Na fase indeterminada é apresentada baixa parasitemia e ausência de sinais clínicos. Já a fase crônica se manifesta após 10 ou 20

anos após a fase aguda e a manifestação clínica mais encontrada é a cardiopatia chagásica (DIAS, 1989; COURA, 2007; ARGOLO et al., 2008; GALVÃO, 2014; WHO, 2017).

Diante dos agravos que a doença de Chagas pode causar, o controle vetorial é de grande importância epidemiológica, pois a infecção está relacionada às características dos vetores, associadas às baixas condições sociais e ação desordenada do homem sobre o meio ambiente (COURA et al., 2007; DIAS, 2011).

1.2. Vetores da doença de Chagas

Atualmente a subfamília Triatominae, conta com 18 gêneros e 151 espécies, das quais duas são fósseis (POINAR, 2005; POINAR, 2013; PAEZ-RONDON et al., 2017). Os triatomíneos, por serem hematófagos obrigatórios, se deslocam de seus respectivos ambientes para se alimentarem de sangue, buscando um reservatório humano ou qualquer outro mamífero (CHAGAS, 1909; WHO, 2017). Dessa forma, os triatomíneos são elos fundamentais para manutenção da cadeia epidemiológica do protozoário *T. cruzi* (VINHAES; DIAS, 2000; ROSA et al., 2014).

A maioria das espécies de triatomíneos habita áreas silvestres, e normalmente usam como abrigos ninhos de gambás, pássaros, abrigos sob pedras, tocas de animais no solo, palmeiras e cada gênero/espécie se mantém num determinado nicho ecológico (LENT; WYGODZINSKI, 1979; FORATTINI, 1980, ARGOLO, 2008). Os triatomíneos se adaptam bem às condições de moradia e de saneamento precários, como irregularidades nas construções rurais e a falta de higiene que favorecem a colonização do vetor (DIAS; SCHOFIELD, 1998).

1.3. Importância epidemiológica e aspectos taxonômicos das espécies de triatomíneos do Rio Grande do Sul.

Em 1957, Di Primio realizou o levantamento das espécies de triatomíneos que ocorrem no Rio Grande do Sul. *Triatoma infestans* foi a espécie mais encontrada nos diferentes municípios do RS, com um número alto de insetos infectados por *T. cruzi*, em segundo lugar *Panstrongylus megistus* (Burmeister), 1835 e em terceiro *T. rubrovaria*, seguidos das espécies *T. circummaculata* e *T. sordida* (STÅL, 1859). Esse levantamento foi importante, pois revelou a situação da endemia, os ecótopos desses vetores, suas fontes alimentares e também as espécies que trazem mais risco à população. Além

disso, as espécies *T. rubrovaria*, *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. oliveirai*, e *Panstrongylus tupynambai* (LENT, 1942) possuem hábitos rupestres e são encontrados em fendas onde predominam rochas com características graníticas ou areníticas, alimentando-se do sangue de vários vertebrados principalmente roedores, mantendo, assim, o ciclo silvestre da tripanossomíase americana, porém somente *T. rubrovaria* pode ser comparado ao *T. infestans* (KLUG, 1834) quanto à sinantropia que é capacidade de invasão domiciliar (ALMEIDA et al., 2000; MARTINS et al., 2006).

Passados mais de 60 anos após os estudos de Di Primio em relação ao levantamento das espécies de triatomíneos do RS, e sua importância epidemiológica, hoje são registradas 12 espécies distribuídas de forma variável, restritas a algumas regiões, acrescentando-se então mais cinco espécies: *T. carcavalloi*, *T. delpontei*, *T. klugi*, *T. platensis*, e descrita recentemente *T. pintodiasi*, lembrando que a espécie *T. rubrovaria*, prevalece como situação de alerta em relação à endemia (MELLO; FIGUEIREDO, 2013; JURBERG et al., 2013; PRIOTTO et al., 2014). Com relação à espécie *T. sordida*, foi relatada apenas por Di Primio no ano de 1957, não havendo mais registro de encontro dessa espécie nos dias de hoje.

1.4. *Triatoma carcavalloi* Jurberg et al., 1998

Os primeiros espécimes de *Triatoma carcavalloi*, foram coletados em domicílio de Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão e Dom Feliciano e esses municípios embora distantes entre si, ocupam uma grande área do estado do Rio Grande do Sul. Os machos medem entre 19,5 e 19,7 mm de comprimento, as fêmeas de 20 a 22 mm, coloração geral preta com lobo posterior laranja ou avermelhado, exceto a metade posterior da linha mediana e duas pequenas submedianas em formas de vírgula que são negras, e marcas avermelhadas no cório e conexivo (JURBERG et al., 1998). Almeida et al., (2014) ao estudarem o ciclo biológico dessa espécie em laboratório verificaram o período de incubação dos ovos, período entre ecdises, taxa de mortalidade e duração do ciclo biológico dos estádios evolutivos.

1.5. *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859)

Triatoma circummaculata, está distribuída no Brasil e Uruguai, em latitudes de 28° a 35° Sul, de 100 a 500 m de altitude, em floresta tropical, subtropical e savanas. No Brasil, sua distribuição geográfica está restrita ao Rio Grande do Sul, ocupa ambientes

similares a *T. rubrovaria*, e as duas espécies podem ser encontradas nos mesmos ecótopos (LENT; WYGODZINSKY, 1979; ROSA et al., 2000). Em um estudo experimento foi observado o hábito alimentar de *T. circummaculata* que as ninfas de 1º estágio sugavam a hemolinfa de baratas silvestres para seguir seu desenvolvimento até adultos (LOROSA et al., 2000). O comprimento total dos machos é de 15 a 16 mm de comprimento, das fêmeas de 15 a 17 mm, coloração geral castanho escuro ou negro, com manchas vermelhas no pronoto, cório e conexivo (LENT; WYGODZINSKI, 1979).

1.6. *Triatoma klugi* Jurberg et al., 2001

Essa espécie foi coletada, em fendas de rochas do morro de Malakov na localidade Linha Brasil, município de Nova Petrópolis RS, após as análises morfológicas os autores concluíram, que se tratava de uma nova espécie nomeada, *Triatoma klugi* (CARCAVALLO et al., 2001). Comprimento total dos machos situa-se entre 24 e 25 mm de comprimento; pronoto com 4 mm de largura; abdômen 8 mm de largura. Fêmeas: comprimento total 25-27 mm, largura do pronoto 4 mm, largura do abdômen 10 mm. Espécimes de cor geral preta, tendo manchas amarelas centrais em cada segmento do conexivo, parte externa do clavo e a base do cório, são escuras as partes distais do cório acinzentadas. Essas são algumas das diversas observações feitas por Carcavallo et al. (2001) em relação a espécie *T. klugi*.

1.7. *Triatoma pintodiasi* Jurberg et al., 2013

Triatoma pintodiasi foi coletada no Rio Grande do Sul e é uma nova espécie muito semelhante a *T. circummaculata*, que recebeu essa denominação em homenagem ao Dr. João Carlos Pinto Dias (JURBERG et al., 2013). Os principais caracteres de diagnose de *T. pintodiasi* são: O tamanho do macho 15mm e da fêmea 16mm, aspectos da coloração geral do espécime sendo castanho escuro. As antenas apresentam um padrão bi cromático no qual 1º e 2º segmentos são escuros e 3º e 4º mais claros; O toráx possui um pronoto com lobo anterior negro e lobo posterior alaranjado e o abdômen possui um conexivo alaranjado com as suturas intersegmentais envolvidas por uma faixa negra estreita, praticamente ausente entre o segundo e o terceiro segmentos.

1.8. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)

Triatoma rubrovaria está distribuída em três países, na Argentina é encontrada em Córdoba, Corrientes, Entre Rios e Misiones; no Brasil, restrita ao Rio Grande do Sul, no e Uruguai (LENT; WYGODZINSKY, 1979; ROSA et al. 2000). Comprimento total das fêmeas, entre 22-25 mm e dos machos 22-24 mm, a largura do abdômen das fêmeas, entre 8 - 12 mm e dos machos 6.5 - 8.5 mm. No geral a coloração da espécie *T. rubrovaria* é preta alaranjada ou vermelha e raramente de cor amarela, essas colorações estão situadas na região do pescoço, pronoto, cório e conexivo. O pronoto é uma estrutura que possui variabilidade cromática com duas cores: preto e vermelho. A cabeça é longa e delgada de cor negra e sutilmente rugosa e transversal na região dorsal, cabeça duas vezes mais longa quanto à largura dos olhos (LENT; WYGODZINSKY, 1979). *Triatoma rubrovaria* vive em simpatria com *T. circummaculata*, ambos associados com *Blaptica rubia*, que se abrigam entre fendas rochosas de aspecto areníticas, até mesmo em baixo de rochas em contato direto com a terra (DI PRIMO, 1957; LENT; WYGODZINSKY, 1979; ROSA et al., 2000; RUAS-NETO; CORSEUIL, 2002; ALMEIDA et al., 2002). O período de desenvolvimento dos estádios ninfais em laboratório à temperatura de 25° C foi estudado por Silva (1985), que verificou ser de 96 dias para os machos e 102 para as fêmeas. Já à temperatura ambiente no Rio de Janeiro, Almeida et al. 2005 observaram que o período de desenvolvimento foi de 180,1 dias. *T. rubrovaria* apresenta variabilidade de coloração no tórax que foi referida por Lent; Wygodzinsky, 1979, porém, Pacheco et al., 2007 ao estudarem o genótipo de populações procedentes da Argentina, Brasil e Uruguai por meio de RAPD e dos espaçadores ITS-1 e ITS-2 verificaram que as populações apresentaram também variações intraespecíficas.

1.9. Subcomplexo *Triatoma rubrovaria*

Os triatomíneos pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e foram divididos em complexos para um melhor entendimento taxonômico devido às similaridades morfológicas, aspectos biogeográficas e barreiras ecológica de modo a auxiliar a identificação, bem como inferir relações filogenéticas (SCHOFIELD, 1988; BARATA 1998; CARCAVALLO et al., 2000; CARCAVALLO et al., 2001; JURBERG, 2003). Com uma nova proposta, de acordo com o arranjo taxonômico, abordando aspectos de classificações evolutivas, baseando-se na biologia

molecular dos triatomíneos, Schofield; Galvão divide o gênero *Triatoma* em oito complexos e nove subcomplexos, entre os oito complexos está inserido o gênero *Mepraia* e *Nesotriatoma* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; ALEVI et al., 2017). Como referência dessa divisão observa-se o complexo *T. infestans* que é formado por sete subcomplexos, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. matogrossensis*, *T. rubrovaria*, *T. sordida* e *T. vitticeps*.

Neste trabalho foram estudadas cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* que conta com sete espécies: *T. carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai* e *T. rubrovaria* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009). *Triatoma pintodiasi* foi inserida nesse grupo por ser muito semelhante a *T. circummaculata* e restrita ao Rio Grande do Sul (JURBERG et al., 2013).

Diversos estudos têm sido realizados com a subfamília Triatominae visando à observação de caracteres morfológicos, de modo a facilitar a identificação de espécies similares. Diversos autores se servem da morfologia e da morfometria por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (LENT; WYGODZINSKY, 1979; JURBERG; ROSA; BARATA, 1997; ROSA et al., 2000). Em investigações mais detalhadas, perfil enzimático, assim como estudos abordando biologia molecular (NEVES et al., 2012; ROSA et al., 2012; JURBERG et al., 2013; SOUZA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Os estudos conduzidos com *T. circummaculata*, *T. carcavalloei*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* poderão conduzir melhor o entendimento entre essas espécies. Como proposta inicial, foram estudadas as espécies *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, pois o que mais chamava a atenção para conduzir os estudos quanto as duas espécies foi variabilidade cromática dessas espécies até então em *T. circummaculata* considerava-se duas variações cromáticas da região do pronoto de preto a alaranjado hoje se entende que a coloração alaranjada é para *T. pintodiasi* e curioso que somente após 159 *T. pintodiasi* foi descrita por Jurberg e colaboradores no ano 2013 e até então do ano de sua descrição *T. pintodiasi* era considerada como *T. circummaculata*, nenhum outro pesquisador havia notado essa distinção, por motivos de corroborar para uma melhor identificação das duas espécies levando em conta que *T. circummaculata* não é mais encontrado em abundância como antigamente no estado do Rio Grande do Sul o fato de aumentar o número de informações quanto aos caracteres dessas duas espécies são relativamente importante. Portanto foram realizadas análises mais detalhadas quanto aos caracteres, morfológicos, morfométricos, assim como da análise da variação gênica tanto de *T. circummaculata* e de *T. pintodiasi*, e para uma

abordagem mais específica quanto ao agrupamento das cinco espécies que fazem parte do subcomplexo *T. rubrovaria* foram utilizadas a mesma ferramentas para *T. carcavalloii*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* de modo a contribuir para reconhecer as relações evolutivas entre os membros desse complexo via reconstrução filogenética. Não foi possível utilizar as espécies *T. limai* e *T. oliverai*, por não terem exemplares para estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Analisar as relações morfológicas, morfométricas e moleculares entre *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever caracteres morfológicos da cabeça, tórax e da genitália externa feminina de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

- Mensurar caracteres da cabeça, tórax, abdômen de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*, assim como proceder às respectivas avaliações estatísticas.

- Avaliar por meio de morfometria geométrica caracteres da cabeça e de asas de adultos fêmeas e machos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*.

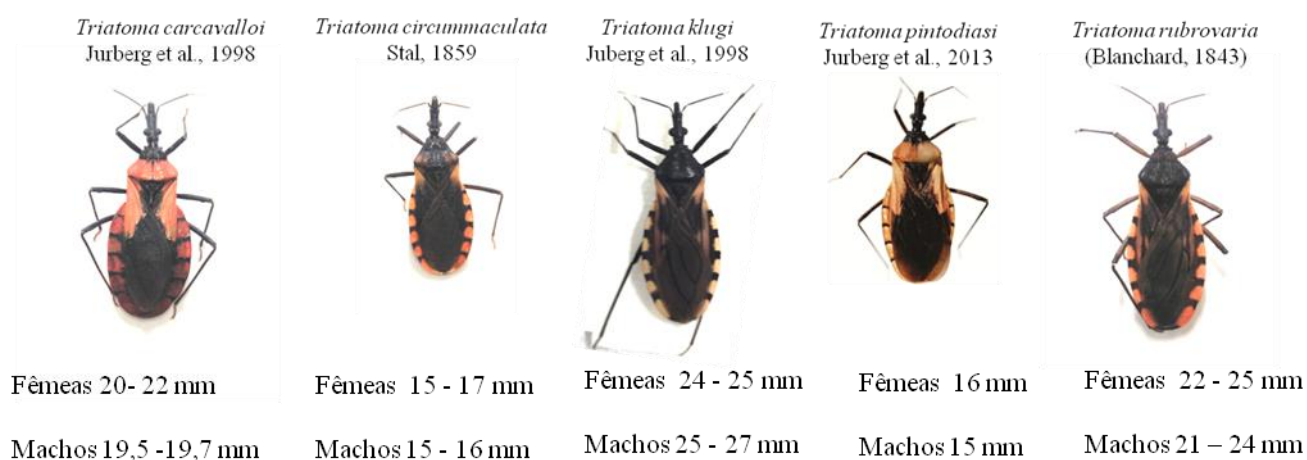
- Analisar as relações evolutivas entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, com base no sequenciamento dos fragmentos de gene ribossomal 16S, citocromo oxidase 1 (COI) e citocromo b (*Cyt b*) do DNA mitocondrial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedência dos triatomíneos utilizados no desenvolvimento do estudo

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados triatomíneos mantidos no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAr (Tab 1) e insetos de campo coletados em 14 localidades de sete municípios do estado do Rio Grande do Sul em 2016 (Tab 2). As coletas foram realizadas durante o dia, por meio de busca ativa em diferentes ecótopos, afloramentos rochosos, entre pedras basálticas e graníticas, e em cercas de pedras, no peridomicílio em baixo de telhas e tijolos, abrigos de aves (Fig 3). Espécimes de triatomíneos foram encontrados no mesmo ecótopo ocupado por blatódeos, assim como o lagarto *Teius oculatus* D’Orbigny & Bibron, 1837. Foram realizados exames para verificar a infecção dos triatomíneos coletados por *T. cruzi*, porém nenhum espécime examinado encontrava-se infectado.

Figura 2. Espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* utilizadas no estudo.



(Imagem *T. pintodiasi* créditos para Jurberg et al., 2013). Demais imagens Fonte: próprio autor

Espécimes

Tabela.1 Espécimes mantidas no insetário, de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP- Araraquara, identificados com código CTA (Colônia de Triatominae de Araraquara),

Espécie:	CTA	Nº Fêmea	Nº Macho
<i>T. carvalhoi</i>	117	15	12
<i>T. klugi</i>	241	15	15
<i>T. rubrovaria</i>	235	15	15

Figura 3. Ambientes onde foram realizadas as coletas por busca ativa durante o dia, no estado do Rio Grande do Sul.



Coleta em ambiente silvestre cerca de pedras imagem (A e B); em (C) coleta em ambiente peridoméstico; em (D) *T. pintodi*.

Tabela 1. Triatomíneos coletados no estado do Rio Grande do Sul.

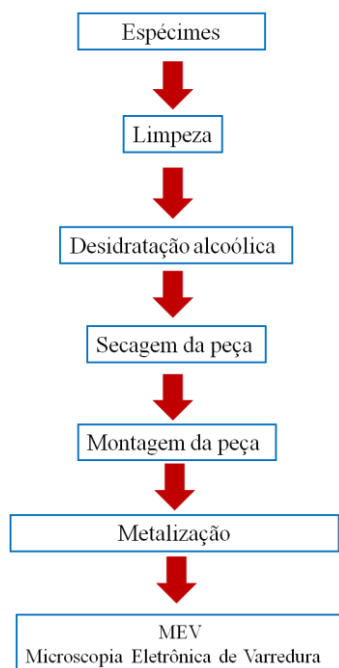
Espécies	Nº de exemplares	Município	Ambiente Coletado	Nº de Localidade	Coordenadas
<i>T. carcavalloii</i>	1	Caçapava do Sul	Silvestre	3	S 30°50.718' W 053°38.050'
<i>T. pintodiasi</i>	62	Caçapava do Sul	Silvestre		S 30°50.684' W 053°38.159'
<i>T. rubrovaria</i>	35	Caçapava do Sul	Peridoméstico/Silvestre		S 30°31.735' W 053°30.52.6'
<i>T. pintodiasi</i>	23	Cachoeira do Sul	Silvestre	1	S 30°20.831' W 052°44.984'
<i>T. pintodiasi</i>	30	Canguçu	Silvestre	1	S 31°23.941' W 052°43.083'
<i>T. pintodiasi</i>	15	Encruzilhada do Sul	Silvestre	1	S 30°36'16.0" W 053°48'50.4
<i>T. carcavalloii</i>	1	Lavras	Silvestre	2	S 30°45.735' W 053°55.299'
<i>T. circummaculata</i>	1	Lavras	Silvestre		S 30°45.735' W 053°55.299'
<i>T. pintodiasi</i>	27	Lavras	Silvestre		S 30°45.735' W 053°55.299'
<i>T. rubrovaria</i>	31	Lavras	Silvestre		S 30°36.266' W 053°48.842'
<i>T. circummaculata</i>	1	São Francisco de Assis	Silvestre	5	S29° 20. 255' W 055°01.175'
<i>T. klugi</i>	2	São Francisco de Assis	Silvestre		S29° 21.085' W 055°23. 53'
<i>T. rubrovaria</i>	84	São Francisco de Assis	Silvestre		S 29° 19. 706' W 055°08.073'
					S29° 20. 255' W 055°01.175'
					S29° 21.085' W 055°23. 53'
					S 29°34.339' W 055°07.644'
					S 29° 19. 706' W 055°08.073'
<i>T. pintodiasi</i>	13	São Jerônimo	Silvestre	1	S 30° 26.861' W 051°58.708'

3.2. Estudo morfológico

No desenvolvimento do estudo morfológico foi utilizada a cabeça, tórax dorsal/ventral e abdômen de fêmeas adultas das cinco espécies. As amostras foram limpas em aparelho de ultrassom, desidratadas em série alcoólica, secas em estufa a 45° por 20 minutos e, em seguida, fixadas em pequenos cilindros de alumínio com esmalte incolor. A seguir foram metalizadas por “sputtering” durante dois minutos com potência de 10mA em aparelho da marca Edwards, segundo Rosa et al., (2010).

Após o processo de metalização as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Topcon SM-300 segundo Rosa et al., (1999).

Figura 4. Fluxograma do estudo morfológico

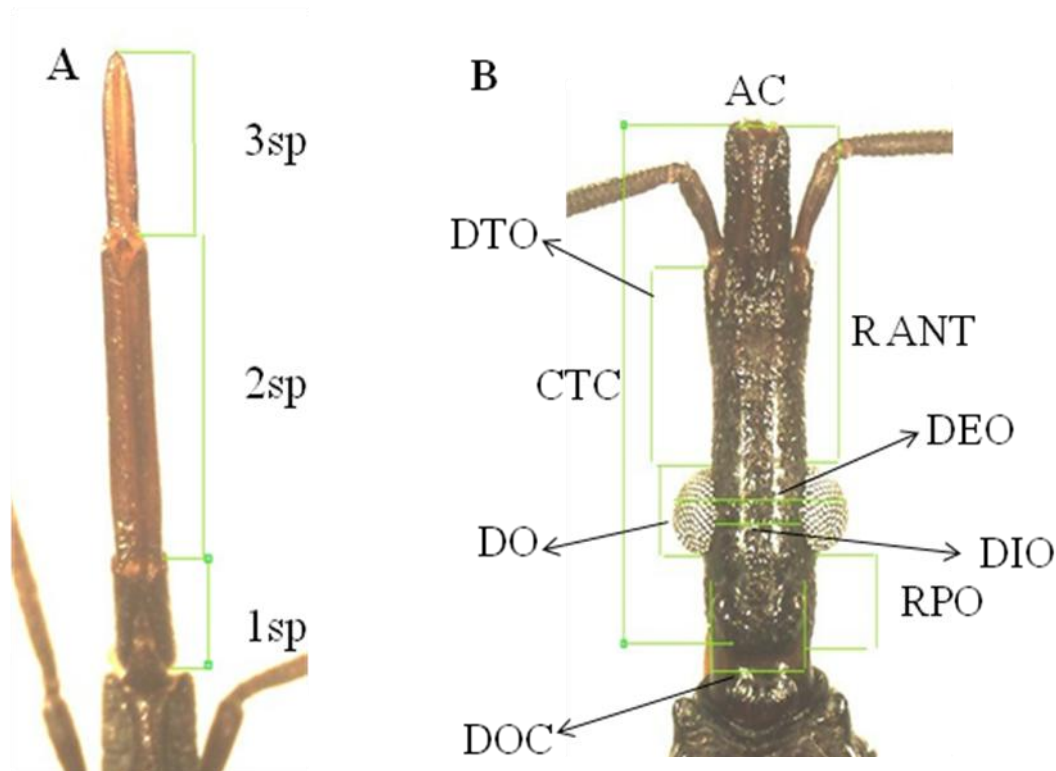


3.3. Análise morfométrica

Foram utilizados fêmeas e machos de triatomíneos adultos das cinco espécies (Tab 1). As amostras foram examinadas em microscópio estereoscópio Leica MZ APO e as imagens foram capturadas no sistema de imagem Motic Advanced 3.2 plus. Foram mensurados 12 parâmetros da cabeça: distância interna e externa entre os olhos, distância entre os ocelos, região antecular, região pós-ocular, comprimento total da cabeça, diâmetro dos olhos, tubérculo antenífero, comprimento dos três segmentos da

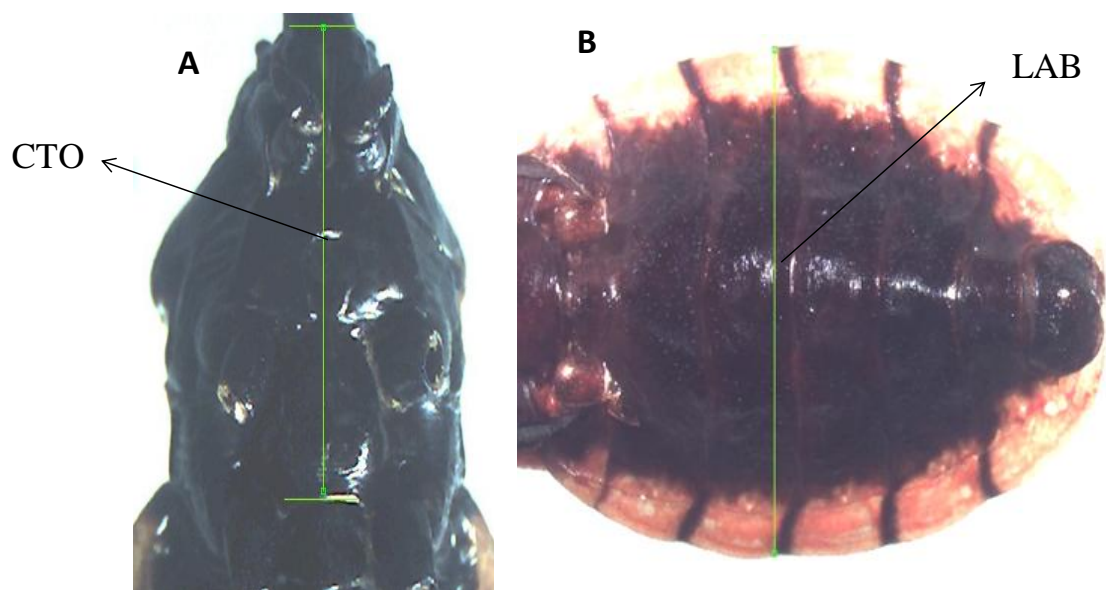
probóscide, anteclípeo (Fig 5), comprimento do tórax, e largura do abdômen (Fig 6), segundo Dujardin et al., (1999).

Figura 5. Parâmetros da cabeça e probóscide utilizados para o estudo morfométrico de *T. carcavalloii*, *T. cicummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



Em (A) 1°, 2° e 3° sp: segmentos da probóscide; em (B) parâmetros da cabeça. AC: largura do anteclípeo; DTO: distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos; R ANT: distância entre o anteclípeo e a região anterior aos olhos; DIO: distância interna entre os olhos; DEO: distância externa entre os olhos; DO: diâmetro dos olhos; R PO: região pós-ocular; DOC: distância externa entre os ocelos; CTC: comprimento total da cabeça. Aumento 20x. (Imagem da probóscide e cabeça *T. klugi*).

Figura 6. Parâmetros do tórax e abdômen utilizados para estudo morfométrico de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



A: Tórax de *T. klugi* (aumento de 6.3X); B: Abdômen de *T. pintodiasi* (aumento de 10X) CTO: comprimento do tórax, LAB: largura do abdomen.

3.4. Morfometria geométrica

Para a análise da morfometria geométrica da cabeça e asa esquerda foram utilizados adultos fêmeas e machos de *Triatoma carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* e como grupo externo *T. petrochiae*. As imagens foram realizadas em microscópio Leica MZ APO e sistema de análise de imagem MotiC Advanced 3.2 plus. (Tab. 3)

Tabela 2. Número de triatomíneos utilizados para realização da morfometria geométrica.

Espécies	Fêmea/asa	Macho/asa	Fêmea/cabeça	Macho/cabeça
<i>T. carcavalloi</i>	10	9	15	15
<i>T. circummaculata</i>	4	4	4	11
<i>T. klugi</i>	12	13	15	15
<i>T. pintodiasi</i>	15	10	15	15
<i>T. rubrovaria</i>	9	15	15	15
<i>T. petrochiae</i>	15	15	15	15

Foi assinalados sete marcos anatômico (landmarks) para a cabeça e para a asa esquerda. Para as asas todos os pontos de referencia anatômicos são do tipo (1). Para a cabeça os pontos 1, 3, 5 e 7 são do tipo (1) o ponto 4 é do tipo (2) e ponto 6 é do tipo (3), segundo Aldana et al., 2011. O software utilizado nas coordenadas da morfometria

geométrica foi o *Collection of Landmarks for Identification and Characterization (CLIC_99)* J-P. Após a realização das análises discriminantes os componentes principais do Procrustes foram construídos os mapas fatoriais (“eigenvalues”, CP1 e CP2). (Figs 7 e 8)

Figura 7. Detalhe da cabeça de adulto fêmea de *T.rubrovaria* com marcação dos sete pontos de referência (landmarks) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software CLICK 99.

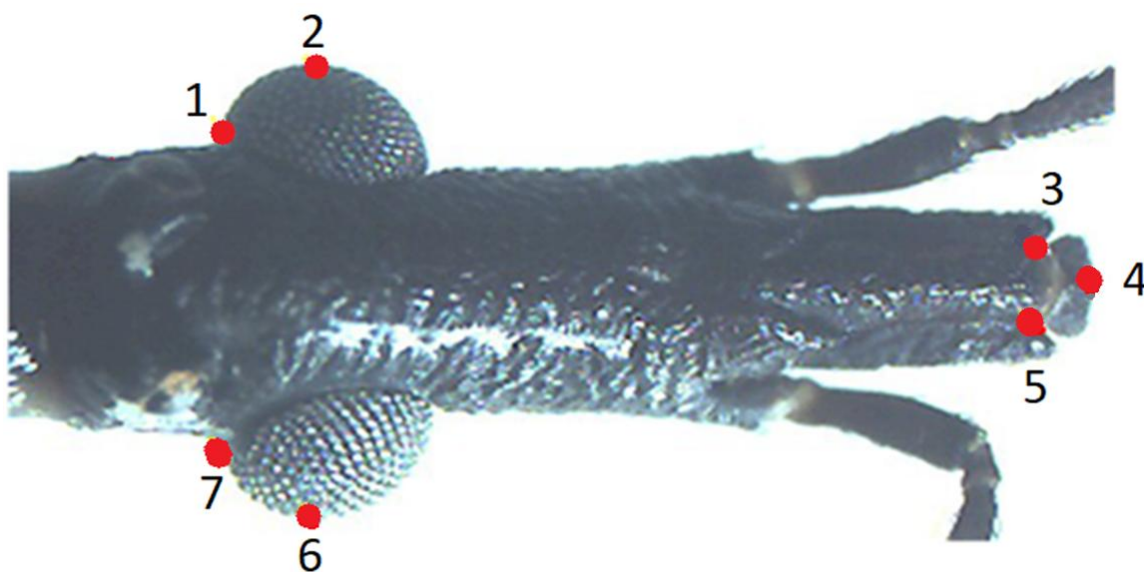


Figura 8. Detalhe da asa esquerda de adulto fêmea de *T.circummaculata* com marcação dos sete pontos de referência (landmarks) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software CLICK 99.



3.5. Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos triatomíneos foi extraído segundo o protocolo modificado de Bargues e Mas-Coma (1997). O tecido de escolha foi a musculatura da perna, por ser livre de microrganismos contaminantes. Foram utilizadas três amostras de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

As pernas dos insetos foram excisadas com auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados, posteriormente a musculatura foi triturada em tubos de Eppendorfs de 1,5 mL, adicionando 400 µL de tampão de digestão, após o rompimento das estruturas do exoesqueleto foi adicionado 100 µL de proteinase K, as amostras lisadas foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a 37° C overnight. Após um período de 12 horas as amostras foram retiradas e adicionou-se clorofórmio álcool isoamilico 25:24:1. Em seguida as amostras foram homogeneizadas no vórtex e colocadas na centrífuga á temperatura de (4°C/ 3 min), velocidade de 14000 rpm, depois tirar as amostras da centrífuga a fase aquosa foi retirada e adicionou-se 2 µL de Rnase. Na sequência foram incubadas em “banho - maria” novamente a (60 °C/ 1hora), após o termino do período de incubação foram adicionados nas amostras 400 µL de álcool isoamilico 25:24:1, a seguir as amostras foram homogeneizadas em vórtex e colocadas na centrífuga a (4°C/ 3 minutos), ressuspensas e novamente foi adicionado o álcool isoamilico 25:24:1. Posteriormente foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas (4°C/ 3 minutos), ressuspensas e em seguida adicionado o álcool isoamilico 24:1 e

centrifugadas (4°C/ 3 minutos) velocidade 14000 rpm. Após adicionar 1 mL de álcool absoluto gelado mais 40 µL de acetato de amônia 4m e centrifugar por 10 minutos 4°C a 14000 rpm, as amostras foram ressuspendidas e adicionou-se 400 mL de álcool 70% e novamente centrifugadas a 4°C por 10 minutos.

A extração do DNA obtido foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. O gel correu em posição horizontal e orientada por um campo constante. Cada amostra de DNA correu por aproximadamente 60 minutos a 100v, utilizando tampão TAE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 100mM pH 8,0, NaCl 100mM, SDS 10%). A migração do DNA foi sinalizada com corante (Gel Safer Dye-Kasvi) e marcador molecular (Ladder 1kb – Invitrogen) Ao término de cada corrida os géis foram fotografados e analisados em transluminador por luz ultravioleta. Amostras utilizadas para extração do DNAg (Tab 1 e 2).

Tabela 4. Iniciadores moleculares utilizados para amplificar o DNA de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Iniciadores	Fonte
CO1 <i>Forward</i> 5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - '3	Folmer et al., (1994)
<i>Reverse</i> 3' - AAACCTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - '3	
Cytb <i>Forward</i> 5' - GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC - '3	Monteiro et al., (2003)
<i>Reverse</i> 5' - ATTACTCCTCCTAGYTTATTAGGAATT - '3	
16s <i>Forward</i> 5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - '3	Weirauch e Munro (2009)
<i>Reverse</i> 5' - CTCCGGTTTGAACCTCAGATCA - '3	

3.6. Amplificação dos fragmentos por (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR)

Para as reações de PCR foi utilizado o termociclador T100TM Thermal Cycler – BIORAD. Os genes COI e 16S passaram por um processo de gradiente que alterava a temperatura de anelamento e para verificar quais temperaturas mostravam condições ideais para amplificação desses fragmentos, portanto a padronização foi igual para COI e 16S e segue abaixo.

Desnaturação inicial	94°C	5:00 minutos	} 35 ciclos
Desnaturação	94°C	0:30 segundos	
Anelamento	44.7°C	1:00 minuto	
Extensão	72°C	2:00 minutos	
Extensão final	72°C	7:00 minutos	

O gene *Cytb* também foi padronizados por um processo de gradiente, alterando a temperatura de anelamento e assim, foram verificadas as condições ideais para amplificação desses fragmentos, a padronização foi igual para ambos os genes e segue abaixo.

Desnaturação inicial	94°C	5:00 minutos	} 35 ciclos
Desnaturação	94°C	0:30 segundos	
Anelamento	64°C	1:00 minuto	
Extensão	72°C	2:00 minutos	
Extensão final	72°C	7:00 minutos	

Para cada reação da PCR a concentração do mix foi de 25µL, seguindo a especificação da enzima (PFU - DNA *Polymerase: Biovision*). Para completar o volume final de 25µL de cada mix foi utilizada água mili-Q autoclavada para os *primers forward* e *reverse*, os iniciadores foram ressuspensos em água deionizada e estéril na concentração final (10,0 picomols). Foram amplificadas três amostras de cada espécie e selecionou-se a melhor para sequenciar. A padronização modificada segue abaixo.

10x PCR Buffer	2.5µL
DNTP mix(2,5 mM)	2µL
<i>Primer forward</i>	1µL
<i>Primer Reverse</i>	1µL
Enzima PFU	0.5µL
MgCl ₂	4 µL
DNAg	2 µl
H ₂ O volume total	11µl

3.7. Purificação e sequenciamento do DNA amplificado

O produto da PCR foi purificado utilizando-se o *Kit “NucleoSpin® Gel and PCR Clean – up* (Macherey – Nagel), de acordo com as instruções do fabricante e para avaliar a concentração do DNA purificado foi utilizado o equipamento *Thermo Scientific NanoDrop®2000*, disponível no CREBIO – UNESP/ Jaboticabal – SP.

As amostras amplificadas das cinco espécies foram encaminhadas para o Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, para realização do sequenciamento, onde foram utilizados os sequenciadores da *Applied (Life Technologies)* ABI3100 e ABI3730XL, que utilizam o *BigDye* na versão 3.1

3.8. Basic Local Alignment Search Tool – BLAST

A avaliação da qualidade das sequências foi baseada na análise dos eletroferogramas por meio do software, *Alignment Editor* e *ClustalW Multiple Alignment* no *BioEdit* versão 7.2.5. Os fragmentos sequenciados passaram por um processo de verificação onde a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível na página do National Center Biotechnology Information (NCBI), indicam alguns valores ao comparar as sequências adquiridas e as depositadas em um banco de dados. Os resultados obtidos conferem alto nível de similaridade com as sequências estudadas (Tab. 9), na quais se conferir por meio dos códigos, as sequências disponíveis no Genbank que deram suporte aos estudos filogenéticos.

3.9. Análise filogenética

O alinhamento das sequências com auxílio do software, *Alignment Editor* e *ClustalW Multiple Alignment* no *BioEdit* versão 7.2.5. Com as sequências consensos foram desenvolvidas análises filogenéticas dos genes COI, Cytb e 16S com auxílio do programa MEGA 7.0, no qual os parâmetros analíticos de distância foram inferidos pelo modelo *Neighbor-Joining*. Para analisar a distância genética dos grupos foi utilizado o modelo Kimura de dois parâmetros (Kimura 2). O comprimento dos ramos gerados representam as proporções de nucleotídeos no momento da divergências entre as espécies. Tendo em vista que uma espécie pode ter um tempo de divergência maior ou anterior a outra. Os valores de *Bootstrap* foram aferidos por 1.000 replicações e os valores acima de 75% foram considerados suportados (GARDIM, 2014).

A análise bayesina das sequências concatenadas dos genes avaliou um fragmento com 1821 pb e considerou modelos analíticos diferentes para cada gene. Os modelos foram estabelecidos com base no programa jModelTest (POSADA, 2008): Cytb (GTR+I+G), 16S (GTR+I+G) e COI (GTR+I).

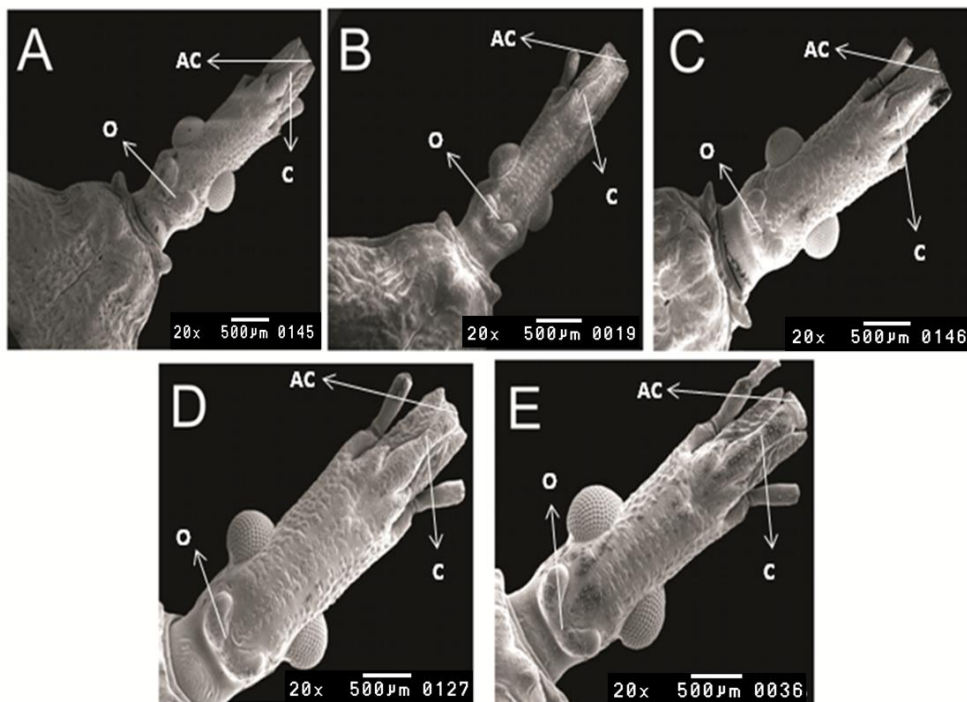
4. RESULTADOS:

4.1. Estudo morfológico por microscopia eletrônica de varredura

4.1.1. Cabeça:

- Ocelos: Em *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* (Fig 9A, 9B) os ocelos formam um vértice e são menores na segunda espécie. Em *T. carcavalloi* (Fig. 9C), os ocelos são separados e dispostos em linha reta. Em *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 9D, 9E) os ocelos são maiores que as demais espécies e se dispõem em formato de “U”.
- Clípeo: Em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. carcavalloi* (Fig. 9A, 6B, 9C) o clípeo é afilado na porção anterior e largo na porção posterior. Em *T. klugi* (Fig. 9D) o clípeo é dividido em três porções: a anterior larga, a mediana estrangulada e a posterior larga e mais robusta. Em *T. rubrovaria* (Fig. 9E) o clípeo é dividido em duas porções, a anterior reta e a posterior larga e robusta.
- Anteclípeo: Em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. carcavalloi* (Fig. 9A, 9B, 9C) é reto. Em *T. klugi* (Fig. 9D) é estreito e arredondado, ao passo que em *T. rubrovaria* (Fig. 9E) é largo e achatado.

Figura 9. Caracteres morfológicos da cabeça de *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



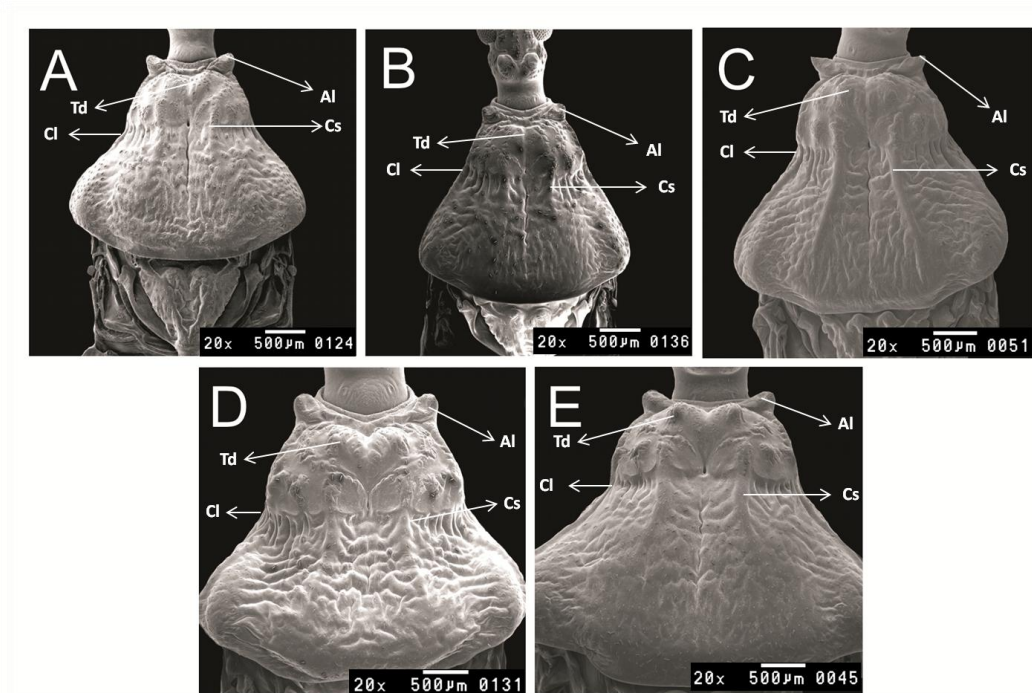
T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* (E). O: Ocelo; C: Clípeo; AC: Anteclípeo.

4.1.2. Tórax

4.1.3 Pronoto:

- Ângulos antero-laterais: Em *T. circummaculata* (Figs. 10A, 12A) a inserção se faz junto ao limite da divisão entre o pescoço e o protorax, são pronunciados e possuem as extremidades posteriores arredondadas. Em *T. pintodiasi* (Figs. 10B, 12B) a inserção se faz abaixo da linha divisória entre o pescoço e o protorax, são curtos, achatados, e não pronunciados. Em *T. carcavalloi* (Figs. 10C, 12C) a inserção se faz abaixo da linha divisória entre o pescoço e o protorax, são curtos e as extremidades são afiladas. Em *T. klugi* (Figs. 10D, 12D) a inserção se faz abaixo da linha divisória entre o pescoço e o protorax, são pronunciados com as extremidades arredondadas e achatadas. Em *T. rubrovaria* (Figs. 10E, 12E) a inserção se faz na linha divisória entre o pescoço e o protorax, são pronunciados e com extremidades arredondadas.
- Carenas laterais: Em *T. pintodiasi* (Fig. 10B) são retas, em *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 10A, 10C, 10D, 10E) são curvadas.
- Carenas submedianas: Em *T. carcavalloi* (Fig. 10C) as carenas são salientes desde o lobo anterior até o posterior; em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 10A, 10B, 10D, 10E) elas são curtas e restritas à porção medial.
- Tubérculos discais: Em *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 10D, 10E) os tubérculos discais são bem salientes ao passo que em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi* (Fig. 10A, 10B, 10C) as saliências não são pronunciadas. Em *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Figs. 10C, 10E) estão inseridos em cutícula lisa e em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. klugi* (Figs. 10A, 10B, 10D) em cutícula rugosa.

Figura 10. Caracteres morfológicos do pronoto de *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

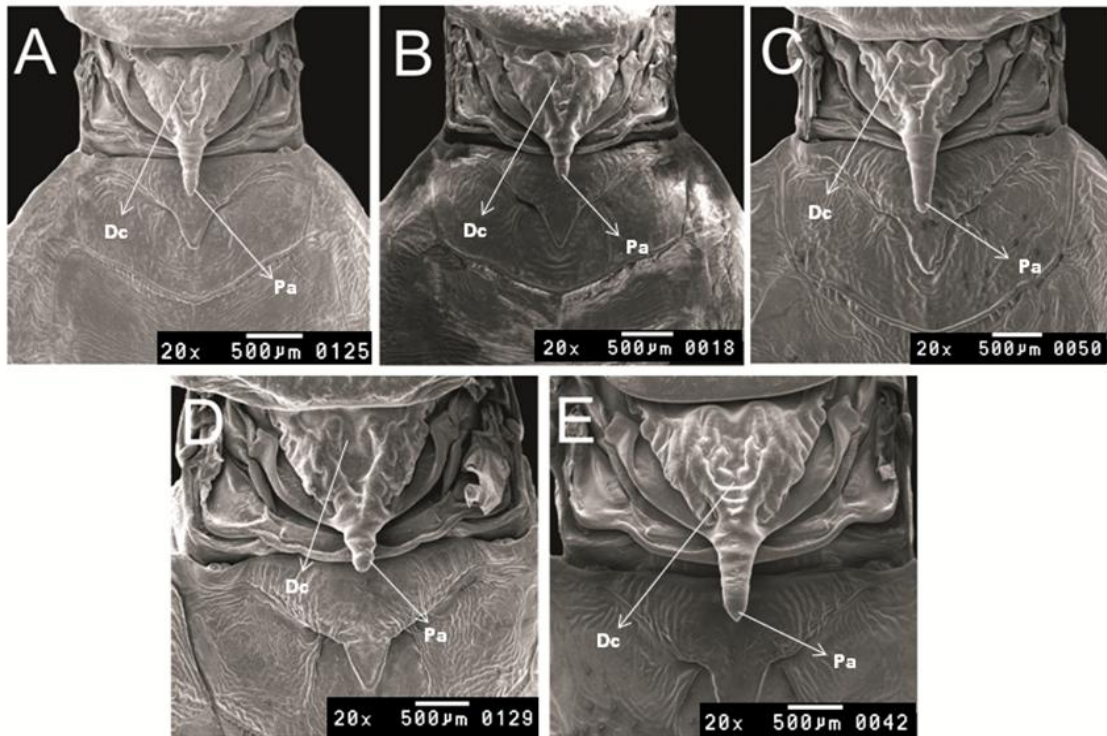


T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* (E) al: ângulo antero-lateral, Cl: carenas laterais; Cs: carenas submedianas; Td: Tubérculo-discal.

4.1.4 Escutelo:

- Processo apical: Em *T. circummaculata*, *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Fig. 11A, 11C, 11E) os processos apicais são longos; em *T. pintodiasi* e *T. klugi* (Fig. 11B, 11D) são curtos. Porém, as pontas dos processos apicais são distintas: afiladas em *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* (Fig. 11A, 11B) em *T. carcavalloi* (fig. 11C) o afileamento é gradativo; em *T. Klugi* (Fig. 11D) em forma esférica; em *T. rubrovaria* (Fig. 11E) termina em forma de “V”.
- Depressão central: Em *T. carcavalloi* (Fig. 11C) é nitidamente delimitada por três linhas grossas irregulares e salientes. Em *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* (Fig. 11A, 11B) as delimitações não são acentuadas. Em *T. klugi* (fig. 11D) existem dois lobos na porção anterior. Em *T. rubrovaria* (Fig. 11E) percebe-se uma linha grossa irregular e saliente na porção posterior.

Figura 4. Caracteres morfológicos do escutelo de *T. circummaculata*, *T. carvalhoi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

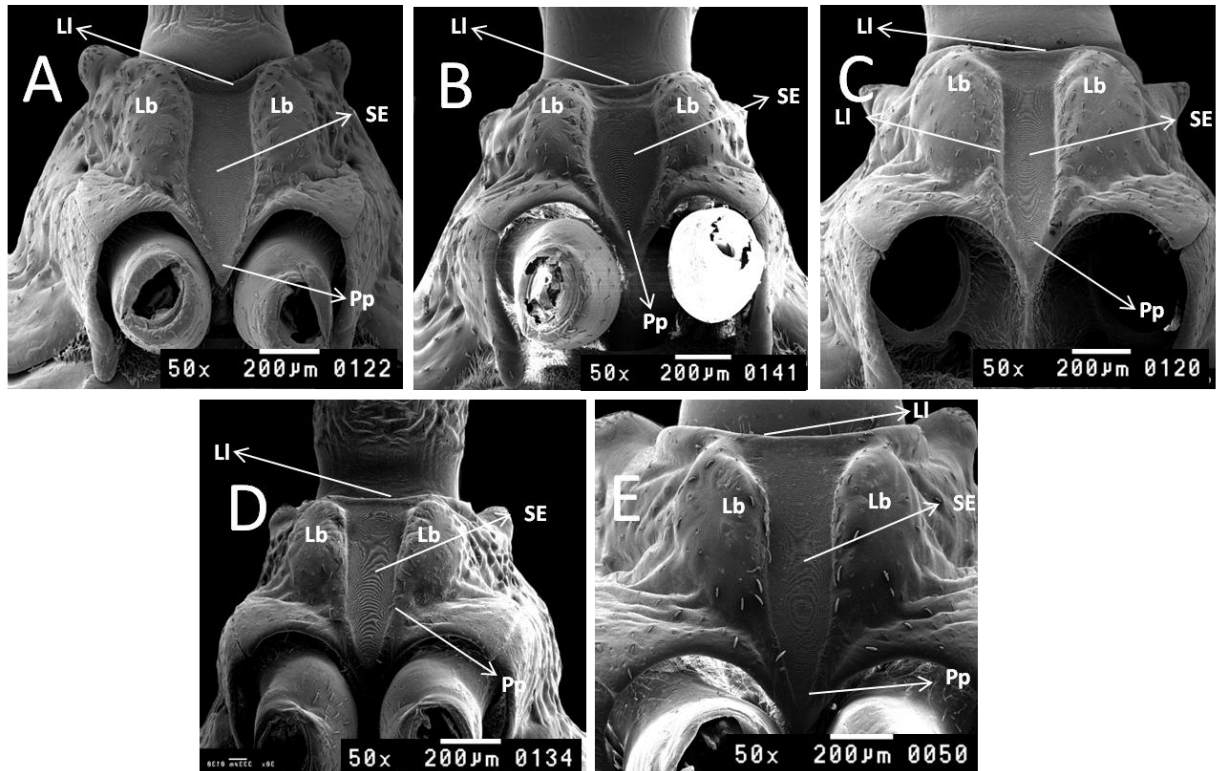


T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carvalhoi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* (E) Pa: processo apical; Dc: depressão central.

4.1.5 Sulco Estridulatório:

- Em *T. circummaculata* (Fig. 12A) a linha limitante do sulco estridulatório apresenta-se curvada na porção anterior e a posterior em forma de “V”. Em *T. pintodiasi* (fig. 12B) o sulco é curto e largo na porção mediana. Em *T. carvalhoi* (Fig. 12C) o sulco é largo na porção anterior e apresenta duas linhas limitantes retas na parte mediana e a posterior em forma de “V”. Em *T. klugi* (Fig. 12D) o limite anterior é reto e a porção posterior afila-se gradativamente. Em *T. rubrovaria* (fig. 12E) a porção anterior é delimitada por lobos salientes, que se iniciam abaixo da linha limitante e é bastante larga quando comparada com as demais espécies; a porção posterior é em forma de “V”.

Figura 5. Sulco estridulatório de *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* SE: sulco estridulatório; Lb: Lobos; LI: Linha limitante; Pp: Porção posterior

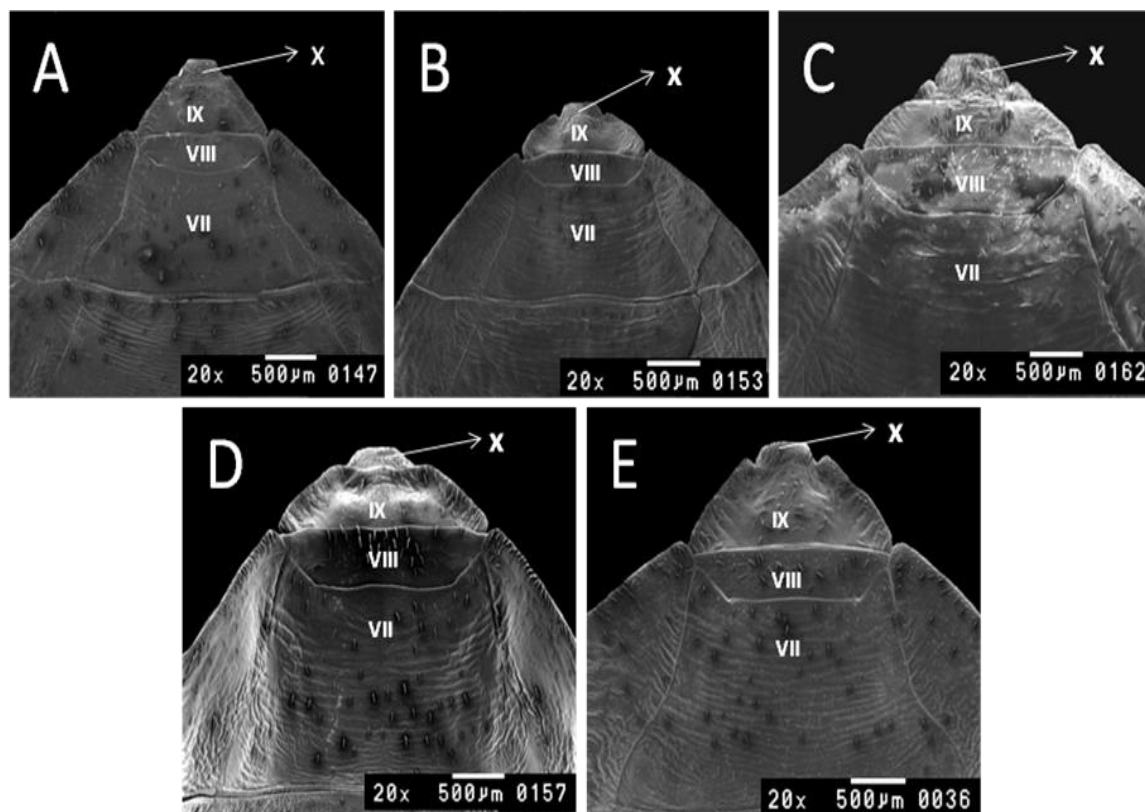
4.1.6 Abdômen

4.1.7. Genitália externa feminina por vista dorsal

- Linha que divide o sétimo e o oitavo segmento: Em *T. circummaculata* (Fig. 13A) a linha é curvada (côncava), em *T. klugi* (Fig. 13D) é irregular; em *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Fig. 13B, 13C, 13E) a linha é reta.
- Linha que divide o oitavo do nono segmento: Em *T. klugi* (Fig. 13D) a linha é irregular e em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Fig. 13A, 13B, 13C, 13E) a linha é reta.
- Formato do nono segmento: Em *T. circummaculata* (Fig.13A) o formato é triangular, em *T. pintodiasi* (Fig. 13B) o nono segmento é curto e apresenta abas laterais. Em *T. carcavalloi* (Fig. 13C) o formato é trapezoidal. Em *T. klugi* (Fig. 13D) o formato é trapezoidal e observam-se duas (1+1) depressões laterais. Em *T. rubrovaria* (Fig. 13E) o formato é trapezoidal e as porções laterais posteriores terminam em ponta.

- Formato do décimo segmento: Em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 13A, 13B, 13C, 13D, 13E) a linha limitante posterior é reta. Em *T. carcavalloi* (Fig. 13C) apresenta duas protuberâncias laterais (1+1) junto ao limite com o nono segmento e é mais longo que nas demais quatro espécies.

Figura 6. Caracteres morfológicos da genitália externa feminina por vista dorsal de *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



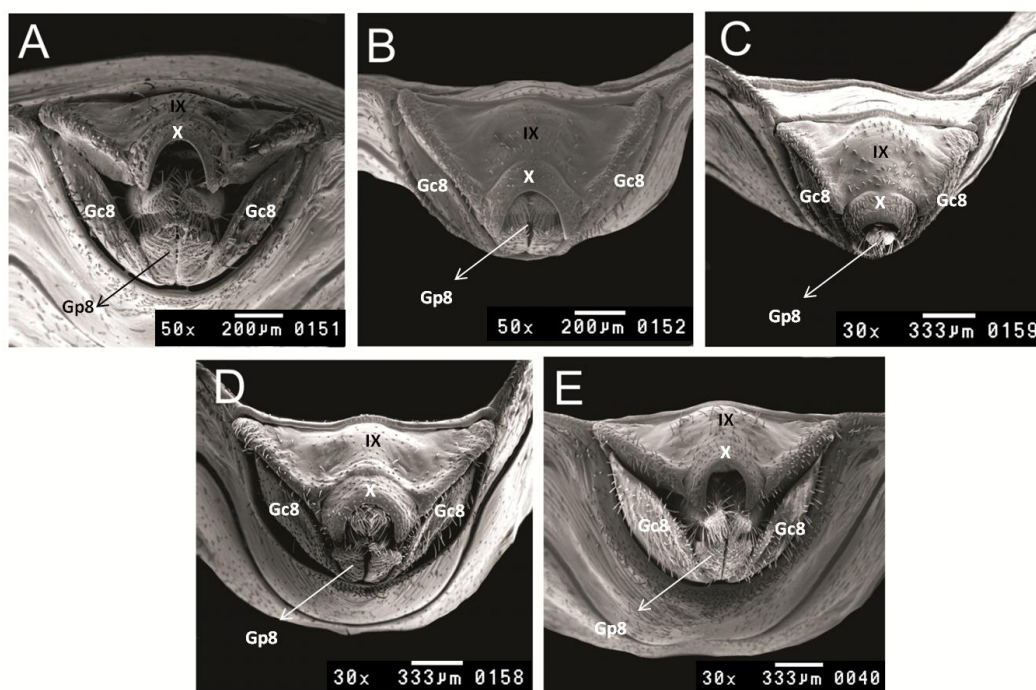
T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* (E) VII, VIII, IX; X segmento do tergito.

4.1.8. Genitália externa feminina por vista posterior

- Formato gonocoxito 8: *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 14A, 14B, 14C, 14D, 14E) apresentam formato peniforme, que variam quanto à dimensão, nitidamente maior em *T. rubrovaria* (Fig. 14E).
- Formato Gonopófise 8: *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 14A, 14B, 14C, 14D, 14E) apresentam formato triangular variam quanto a dimensão, entretanto não é tão nítido em *T. carcavalloi* como nas demais espécies.

- Nono segmento: *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 14A, 14B, 14C, 14D, 14E) apresentam uma protuberância central arredondada, que é mais nítida em *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*.
- Décimo segmento: *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Fig. 14A, 14B, 14C, 14D, 14E) apresenta-se em forma de “U” com contornos mais fechados ou mais abertos.

Figura 7. Caracteres morfológicos da genitália externa feminina por vista posterior de *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



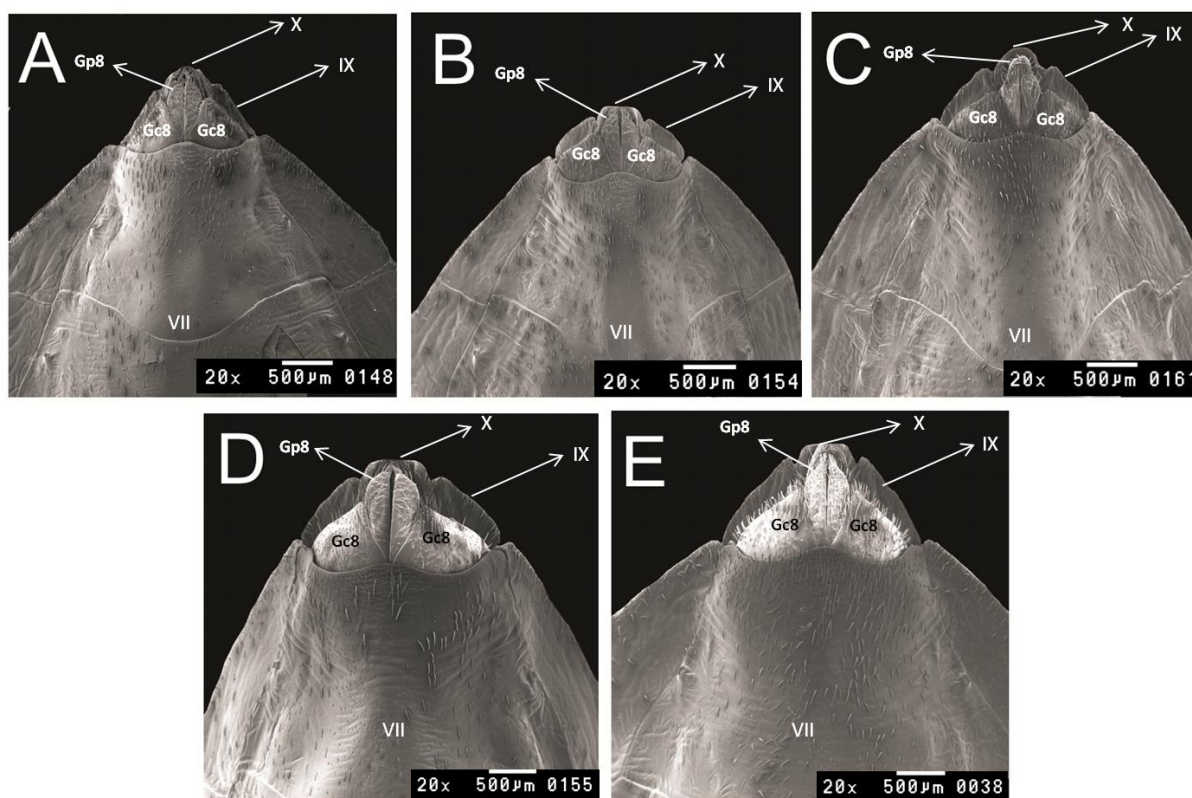
T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* (E) Gc8: conocoxito; Gp8: Gonopóise 8; IX: do tergito; X segmento do tergito.

4.1.9. Genitália externa feminina por vista ventral

- Linha divisória do segmento VII com os gonocoxitos 8: Essa linha é côncava nas laterais (1+1), e convexa na porção central e semelhante nas cinco espécies.
- Segmento IX: É reto nas laterais (1+1) em *T. circummaculata* e curvo formando como que abas nas demais quatro espécies.
- Segmento X: É curvo na extremidade posterior em *T. carcavalloi* (Fig. 15 C) e reto nas demais quatro espécies (Figs. 15A, 15B, 15D, 15E).

- Gonocoxito 8: Em *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* (Figs. 15A, 15B, 15C, 15D, 15E) os gonocoxitos 8 são triangulares.
- Gonapófise 8: Em *T. circummaculata* (Fig.15A) a porção posterior é curva; em *T. pintodiasi* (Fig. 15B) é triangular. Em *T. carcavalloi* e *T. klugi* (Fig. 15C) são arredondadas; em *T. rubrovaria* (Fig. 15E) são afiladas na porção posterior
- O formato do conjunto gonocoxito 8, gonapófise 8, segmentos IX e X é triangular em *T. circummaculata* (Fig. 15A). Em *T. pintodiasi* e *T. carcavalloi* (Figs. 15B, 15C) é mais largo que curto. Em *T. klugi* (Fig. 15 D) terminam em pontas arredondadas e em *T. rubrovaria* (Fig. 15E) as porções posteriores terminam em pontas afiladas.

Figura 8. Caracteres morfológicos da genitália externa feminina por vista ventral de *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.



T. circummaculata (A), *T. pintodiasi* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. rubrovaria* (E) Gp8: Gonapófise 8; Gc8: Gonocoxito 8; VII, IX e X segmento do tergito

4.2. Estudo morfométrico

4.2.1 Estudos morfométricos de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

1) Largura do anteclypeo: *T. circummaculata* apresentou a menor largura e *T. rubrovaria* a maior; 2) Distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos: *T. pintodiasi* possui a menor distância e *T. klugi* a maior; 3) Distância entre o anteclypeo e a região anterior aos olhos: *T. pintodiasi* mostrou menor distância e *T. klugi* a maior; 4) Distância interna entre os olhos: *T. circummaculata* apresentou menor distância e *T. klugi* a maior; 5) Distância externa entre os olhos: *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* possuem a mesma distância, *T. klugi* a maior; 6) Diâmetro dos olhos: *T. pintodiasi* mostrou o menor e *T. klugi* o maior diâmetro; 7) Região pós-ocular: *T. circummaculata* possui a menor distância e *T. klugi* a maior; 8) Distância externa entre os ocelos: *T. pintodiasi* apresentou a menor distância, *T. klugi* e *T. rubrovaria* apresentaram as mesmas distâncias; 9) Comprimento total da cabeça: *T. pintodiasi* possui o menor e *T. klugi* o maior comprimento; 10) Primeiro segmento da probóscide: *T. pintodiasi* apresentou o menor comprimento e *T. klugi* o maior; 11) Segundo segmento da probóscide: *T. circummaculata* possui o menor e *T. klugi* o maior comprimento; 12) Terceiro segmento da probóscide: *T. rubrovaria* o menor, *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* mostraram os mesmos comprimentos e *T. klugi* o maior; 13) Comprimento do tórax: *T. pintodiasi* apresentou o menor e *T. klugi* o maior; 14) Largura do abdômen: *T. pintodiasi* possui a menor largura e *T. klugi* a maior. (Tabela 3).

4.2.2 Análises de variância entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Triatoma carcavalloi e *T. circummaculata* possuem diferenças significantes em 11 parâmetros. *T. carcavalloi* e *T. klugi* mostram significância quanto às dimensões em 14 parâmetros. *T. carcavalloi* e *T. pintodiasi* apresentam diferenças significantes em 11 parâmetros. *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* mostraram diferenças significantes em 12 parâmetros. Em *T. circummaculata* e *T. klugi* foram verificadas diferenças significantes em 13 parâmetros. *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* mostram diferença significativa em dois parâmetros. *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* mostraram diferenças significantes em 13 parâmetros. Com relação às espécies *T. klugi* e *T. pintodiasi* as diferenças significantes foram verificadas em 13 parâmetros. *T. klugi* e *T. rubrovaria* apresentam

diferenças significantes em 10 parâmetros. *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* apresentaram diferenças significantes em 14 parâmetros (Tabela 4).

Tabela 5. Estudo estatístico de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Parâmetros ♀	<i>T. carcavalloi</i>		<i>T. circummaculata</i>		<i>T. klugi</i>		<i>T. pintodiasi</i>		<i>T. rubrovaria</i>	
	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP
AC	0.41	0.024	0.30	0.022	0.050	0.037	0.31	0.018	0.46	0.041
DTO	1.4	0.056	0.98	0.026	1.8	0.097	0.97	0.035	1.5	0.11
R ANT	2.6	0.085	2.0	0.019	3.2	0.14	1.9	0.10	2.8	0.15
DIO	0.96	0.038	0.63	0.024	1.2	0.056	0.67	0.032	0.95	0.062
DEO	1.9	0.13	1.4	0.081	2.3	0.084	1.4	0.064	2.1	0.090
DO	0.72	0.036	0.65	0.035	0.90	0.047	0.58	0.029	0.89	0.053
RPO	0.69	0.051	0.57	0.035	0.80	0.053	0.61	0.030	0.76	0,051
DOC	1.0	0.031	0.86	0.015	1.2	0.051	0.79	0.029	1.2	0.029
CTC	4.0	0.12	3.2	0.090	5.0	0.15	3.1	0.14	4.4	0.22
1°SP	0.92	0.83	0.84	0.12	1.3	0.18	0.59	0.047	1.1	0.060
2°SP	1.9	0.20	1.5	0.18	2.9	0.23	1.6	0.20	2.4	0.16
3°SP	1.3	0.19	1.4	0.28	1.5	0.18	1.4	0.16	1.2	0.056
CTO	4.5	0.16	3.8	0.23	5.6	0.27	3.6	0.15	5.0	0.25
LAB	7.3	0.36	6.6	0.30	8.0	0.43	6.1	0.33	7.8	0.57

MED: Média; DP: Desvio Padrão, cabeça. AC: Largura do anteclypeo; DTO: Distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos; R ANT: Distância entre o anteclypeo e a região anterior aos olhos; DIO: Distância interna entre os olhos; DEO: Distância externa entre os olhos; DO: Diâmetro dos olhos; RPO: Região Pós-ocular; DOC: Distância externa entre os ocelos; CTC: Comprimento total da cabeça; 1°, 2° e 3° SP: Segmentos da Probóscide; CTO: comprimento do tórax e LAB: Largura do abdômen. Em negrito, as menores e maiores média, em vermelho média idêntica.

Tabela 6. Análises de Variância ($P < 0.05$) das mensurações de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de *Triatoma carcavallo*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Parâmetros(♀)	<i>T.car/T.cir</i>	<i>T.car/T.klu</i>	<i>T.car/T.pin</i>	<i>T.car/T.r</i>	<i>T.cir/klu</i>	<i>T.cir/T.pint</i>	<i>T.cir/T.r</i>	<i>T.klu/T.pin</i>	<i>T.klu/T.r</i>	<i>T.pin/T.r</i>
AC	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
DTO	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
R ANT	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
DIO	*	*	*	NS	*	NS	*	*	*	*
DEO	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
DO	*	*	*	*	*	NS	*	*	NS	*
RPO	*	*	*	*	*	NS	*	*	NS	*
DOC	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	*
CTC	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
1°SP	NS	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2°SP	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
3°SP	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	*
TO	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
LAB	NS	*	*	*	*	NS	*	*	NS	*

ANOVA e Pós-teste (TUKEY), significância entre as espécies* e não significância NS. Parâmetros da cabeça AC: Largura do anteclypeo; DTO: Distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos; R ANT: Distância entre o anteclypeo e a região anterior aos olhos; DIO: Distância interna entre os olhos; DEO: Distância externa entre os olhos; DO: Diâmetro dos olhos; RPO: Região Pós-ocular; DOC: Distância externa entre os ocelos; CTC: Comprimento total da cabeça; 1°, 2° e 3° SP: Segmentos da Probóscide; CTO: comprimento do tórax e LAB: Largura do abdômen.

4.2.3 Estudos morfométricos de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de machos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

1) Largura do anteclypeo: *T. pintodiasi* apresentou a menor largura e *T. klugi* a maior; 2) Distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos: *T. pintodiasi* possui a menor distância e *T. klugi* a maior; 3) Distância entre o anteclypeo e a região anterior aos olhos: *T. pintodiasi* mostrou menor distância e *T. klugi* a maior e *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* apresentaram a mesma distância; 4) Distância interna entre os olhos: *T. circummaculata* apresentou menor distância e *T. carcavalloi* a maior; 5) Distância externa entre os olhos: *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* possuem a mesma distância, *T. klugi* a maior; 6) Diâmetro dos olhos: *T. pintodiasi* mostrou a menor e *T. rubrovaria* o maior diâmetro; 7) Região pós-ocular: *T. circummaculata* possui a menor e *T. klugi* a maior distância; 8) Distância externa entre os ocelos: *T. pintodiasi* apresentou a menor, *T. klugi* a maior distância; 9) Comprimento total da cabeça: *T. pintodiasi* possui o menor e *T. klugi* o maior comprimento; 10) Primeiro segmento da probóscide: *T. pintodiasi* apresentou o menor comprimento, *T. klugi* e *T. rubrovaria* idênticos; 11) Segundo segmento da probóscide: *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* apresentaram o mesmo comprimento, *T. klugi* e *T. rubrovaria* também; 12) Terceiro segmento da proboscide: *T. klugi* e *T. rubrovaria* comprimentos idênticos, *T. carcavalloi* e *T. pintodiasi* também e *T. circummaculata* o maior 13) Comprimento do tórax: *T. pintodiasi* apresentou o menor e *T. klugi* o maior; 14) Largura do abdômen: *T. circummaculata* possui a menor largura e *T. carcavalloi* a maior. (Tabela 5).

4.2.4 Análises de variância entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Triatoma carcavalloi e *T. circummaculata* possuem diferenças significantes em 14 parâmetros. *T. carcavalloi* e *T. klugi* mostram significância quanto às dimensões em 11 parâmetros. *T. carcavalloi* e *T. pintodiasi* apresentam diferenças significantes em 13 parâmetros. *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* mostraram diferenças significantes em sete parâmetros. Em *T. circummaculata* e *T. klugi* foram verificadas diferenças significantes em 14 parâmetros. *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* mostram diferença significante em dois parâmetros. *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* mostraram diferenças significantes em 14 parâmetros. Com relação às espécies *T. klugi* e *T.*

pintodiasi foram verificadas diferenças significantes em 13 parâmetros. *T. klugi* e *T. rubrovaria* apresentam diferença significante em oito parâmetros. *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* apresentaram diferenças significantes em 13 parâmetros (Tabela 6)

Tabela 7. Estudo estatística de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdômen de machos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Parâmetros(♂)	<i>T. carcavalloi</i>		<i>T. circummaculata</i>		<i>T. klugi</i>		<i>T. pintodiasi</i>		<i>T. rubrovaria</i>	
	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP
AC	0.38	0.015	0.32	0.033	0.46	0.045	0.30	0.012	0.42	0.055
DTO	1.3	0.081	0.97	0.055	1.6	0.11	0.89	0.050	1.3	0.13
R ANT	2.5	0.14	2.0	0.097	2.8	0.17	1.8	0.077	2.5	0.18
DIO	0.90	0.055	0.60	0.063	1.0	0.10	0.62	0.043	0.86	0.033
DEO	1.9	0.10	1.4	0.072	2.2	0.10	1.4	0.065	2.0	0.082
DO	0.71	0.042	0.63	0.060	0.87	0.050	0.58	0.039	0.88	0.046
RPO	0.66	0.088	0.55	0.043	0.75	0.077	0.58	0.030	0.68	0.065
DOC	0.99	0.046	0.82	0.059	1.2	0.085	0.78	0.037	1.1	0.056
CTC	3.9	0.23	3.1	0.17	4.4	0.29	3.0	0.11	4.1	0.30
1°SP	1.0	0.085	0.75	0.10	1.1	0.15	0.59	0.047	1.1	0.072
2°SP	2.0	0.15	1.5	0.14	2.3	0.26	1.5	0.13	2.3	0.21
3°SP	1.3	0.086	1.5	0.14	1.2	0.18	1.3	0.15	1.2	0.087
CT	4.6	0.26	3.7	0.21	5.4	0.27	3.6	0.14	5.1	0.31
LAB	7.00	0.34	5.7	0.39	6.8	0.21	5.9	0.31	6.6	0.41

MED: Média; DP: Desvio Padrão, cabeça. AC: Largura do anteclypeo; DTO: Distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos; R ANT: Distância entre o anteclypeo e a região anterior aos olhos; DIO: Distância interna entre os olhos; DEO: Distância externa entre os olhos; DO: Diâmetro dos olhos; RPO: Região Pós-ocular; DOC: Distância externa entre os ocelos; CTC: Comprimento total da cabeça; 1°, 2° e 3° SP: Segmentos da Probóscide; CTO: comprimento do tórax e LAB: Largura do abdômen. Em negrito, as menores e maiores média, em vermelho média idêntica.

Tabela 8. Análises de variância ($P < 0.05$) do estudo morfométrico de 14 caracteres da cabeça, tórax e abdômen de machos de *Triatoma carcavallo*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Parâmetros(♂)	<i>T.car/T.cir</i>	<i>T.car/T.klu</i>	<i>T.car/T.pin</i>	<i>T.car/T.r</i>	<i>T.cir/klu</i>	<i>T.cir/T.pint</i>	<i>T.cir/T.r</i>	<i>T.klu/T.pin</i>	<i>T.klu/T.r</i>	<i>T.pin/T.r</i>
AC	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
DTO	*	*	*	NS	*	NS	*	*	*	*
R ANT	*	*	*	NS	*	NS	*	*	*	*
DIO	*	*	*	NS	*	NS	*	*	*	*
DEO	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
DO	*	*	*	*	*	NS	*	*	NS	*
RPO	*	*	*	NS	*	NS	*	*	*	*
DOC	*	*	*	*	*	NS	*	*	NS	*
CTC	*	*	*	NS	*	NS	*	*	*	*
1°SP	*	NS	*	NS	*	*	*	*	NS	*
2°SP	*	*	*	*	*	NS	*	*	NS	*
3°SP	*	NS	NS	NS	*	*	*	NS	NS	NS
TO	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*
LAB	*	NS	*	*	*	NS	*	*	NS	*

ANOVA e Pós-teste (TUKEY), significância entre as espécies* e não significância NS. Parâmetros da cabeça AC: Largura do anteclypeo; DTO: Distância entre o tubérculo antenífero e a região anterior dos olhos; R ANT: Distância entre o anteclypeo e a região anterior aos olhos; DIO: Distância interna entre os olhos; DEO: Distância externa entre os olhos; DO: Diâmetro dos olhos; RPO: Região Pós-ocular; DOC: Distância externa entre os ocelos; CTC: Comprimento total da cabeça; 1°, 2° e 3° SP: Segmentos da Probóscide; CTO: comprimento do tórax e LAB: Largura do abdômen.

4.3 Morfometria geométrica

4.3.1 Variabilidade de tamanho das cabeças e asas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*, *T. rubrovaria* e *T. petrochiae*

Os valores do tamanho dos centroides possibilitaram estimar as variabilidades morfométricas entre as espécies estudadas (Figs. 16, 17, 18 e 19).

Triatoma klugi (3), *T. rubrovaria* (5) e *T. petrochiae* (6) apresentam a maior média de tamanho do centroide de cabeça de fêmeas e machos (Figs. 16, 17) e *T. carcavalloi* (1), *T. circummaculata* (2) e *T. pintodiasi* (4) apresentam as menores médias de tamanho (Figs. 16, 17).

Pode-se perceber que os valores do tamanho do centroide das cabeças variam entre os sexos, mostrando um consistente dimorfismo sexual.

Figura 16. Variação do tamanho médio do centroide das cabeças de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*, *T. rubrovaria* e *T. petrochiae*.

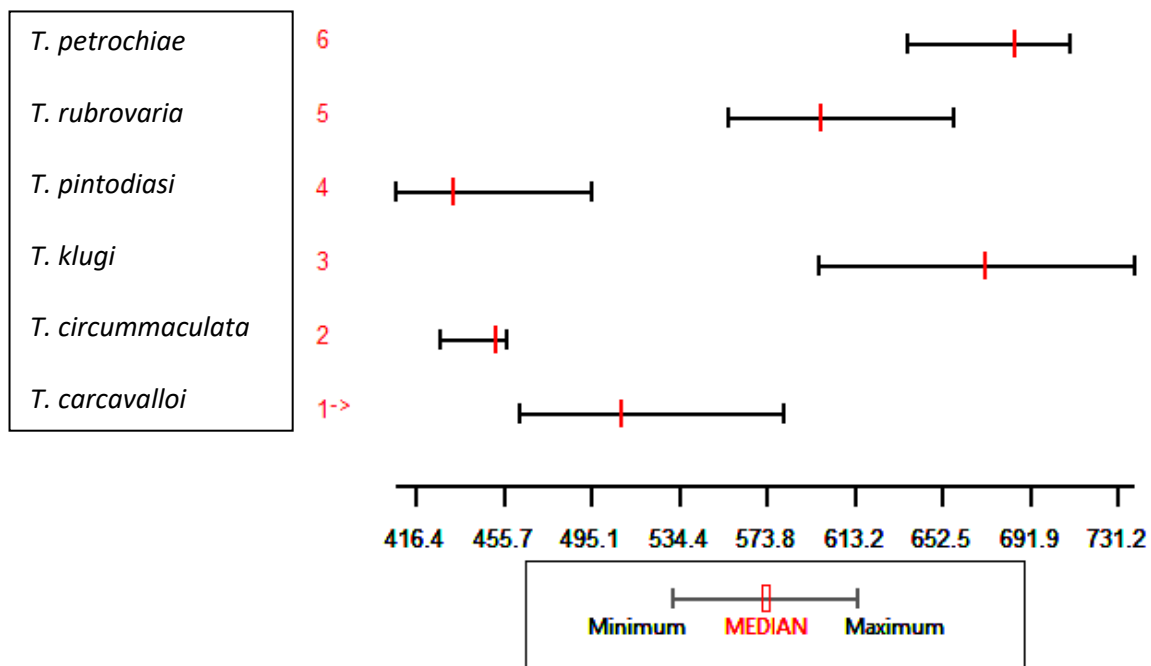
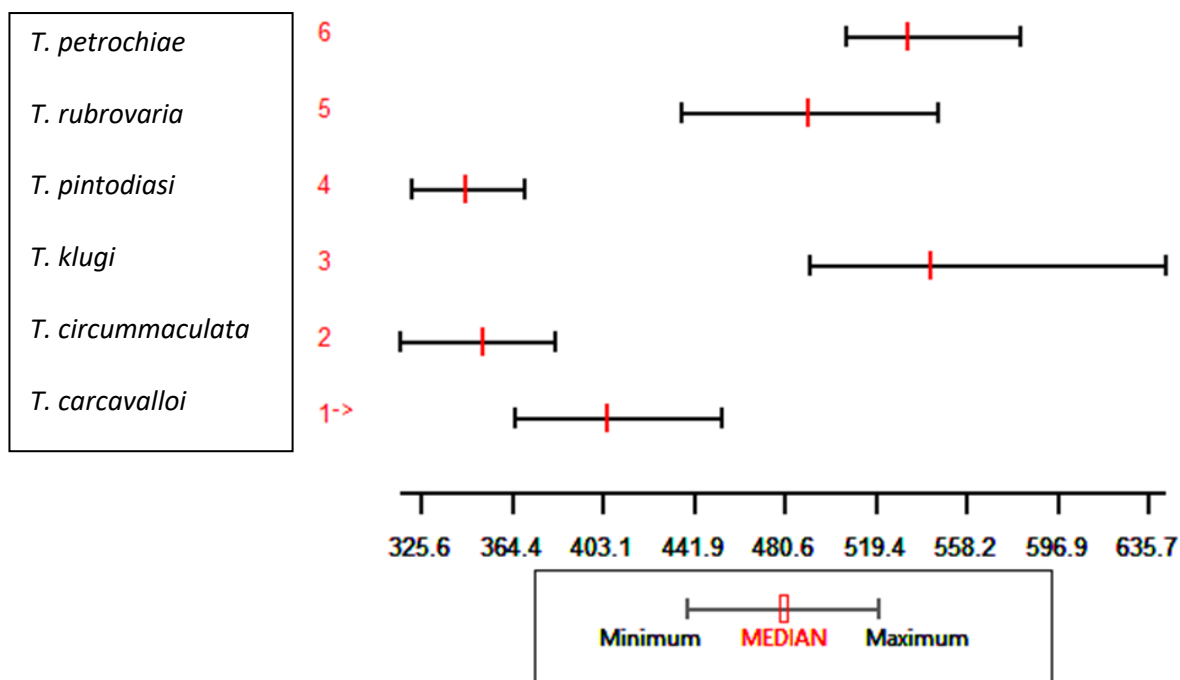


Figura 17. Variação do tamanho médio do centroide das cabeças de machos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*, *T. rubrovaria* e *T. petrochiae*.



Triatoma carcavalloi (1), *T. klugi* (3) e *T. rubrovaria* (5) apresentam a maior média de tamanho do centroide de asas de fêmeas e machos (Figs. 18, 19). *T. petrochiae* (6) apresentou valores expressivos para o parâmetro da cabeça (Figs. 16, 17), mas o mesmo não foi percebido nos resultados das asas (Figs. 18, 19), nota-se que as espécies apresentam o menor valor médio.

O tamanho dos centroides das asas de *T. circummaculata* (2) e *T. pintodiasi* (4), mantiveram o padrão das cabeças, ou seja, apresentaram valores médios inferiores quando comparado as demais espécies (Fig. 18). Além disso, é evidente o dimorfismo sexual, menos consistente que o percebido nas cabeças.

Figura 18. Variação do tamanho médio do centroide das asas de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*, *T. rubrovaria* e *T. petrochiae*.

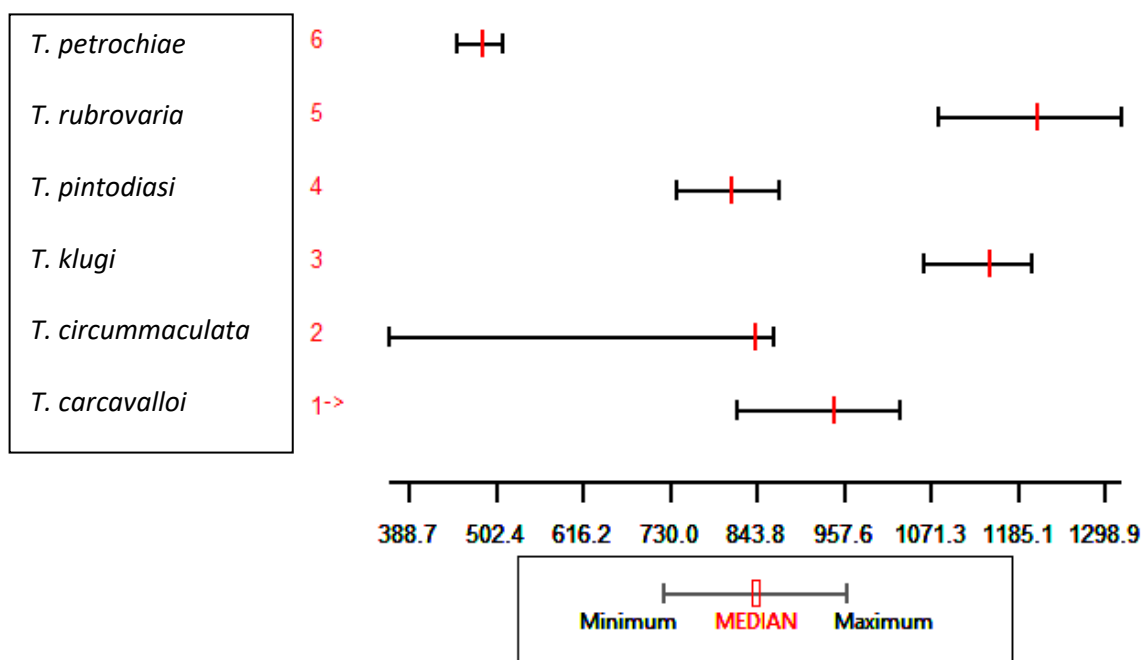
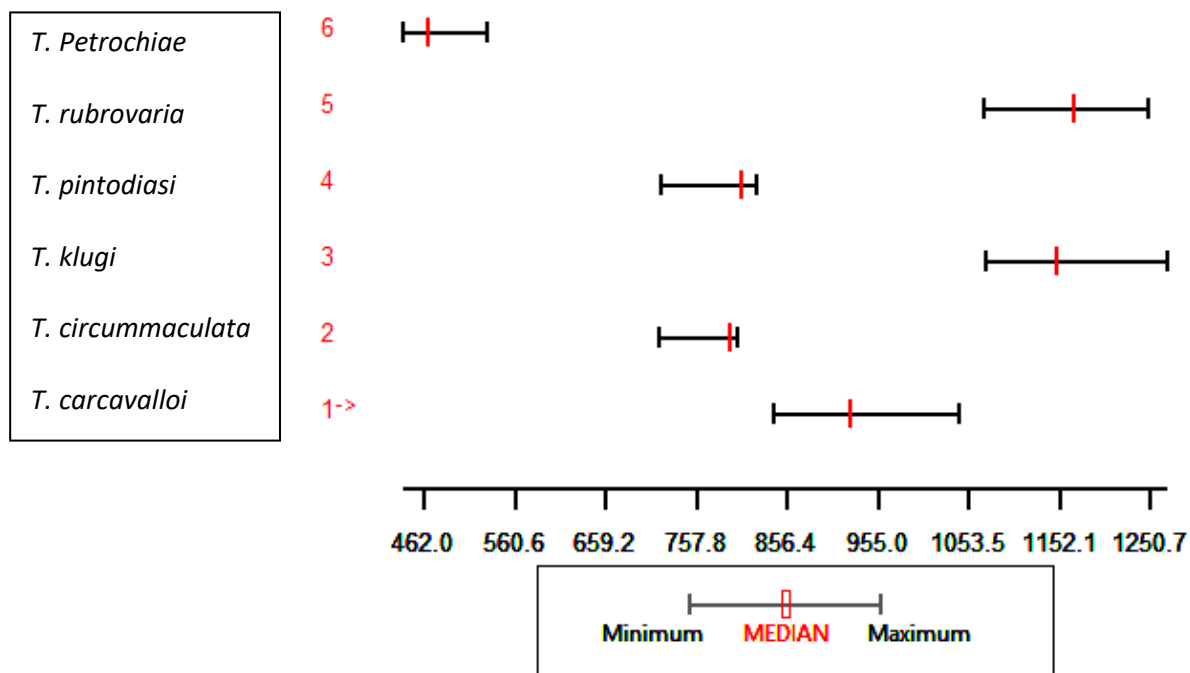


Figura19. Variação do tamanho médio do centroide das asas de machos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*, *T. rubrovaria* e *T. petrochiae*.



4.3.2 Variabilidades de forma entre cabeças e asas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

As análises dos componentes principais possibilitaram discriminar as diferenças entre as formas das cabeças e as formas alares de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

Os resultados das análises dos componentes principais (PCA) de cabeça de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, mostram que o primeiro componente principal (CP1) representou 50.1% e o segundo componente principal (CP2) representou 17.8%, juntos explicam 67.9% da variabilidade total de forma e tamanho (Fig. 20, A).

Para os resultados da análise dos PCA de cabeças de machos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, mostram que CP1 representou 44.7% e o CP2 representou 27.3% juntos explicam 72% da variabilidade total de forma e tamanho. (Fig. 20, B).

A partir das análises discriminantes de cabeça de fêmeas e machos obtiveram-se os mapas fatoriais que indicam a forma clara e a disposição de cada espécie, bem como as variações correspondente de cada individuo (Fig.20 A e B). Como grupo externo *T. petrochiae* que está projetado junto às demais espécies.

Os resultados da PCA, para comparar asas de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, mostram que o CP1 representou 38.2% e o CP2 representou 28.1% juntos correspondem a 66.3% da variabilidade total da forma e tamanho (Fig. 21, A).

Quanto os resultados da PCA para comparar asas de machos entre *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, mostram que o CP1 representou 48.9% e o CP2 representou 18.7% juntos explicam 67.6% da variabilidade total da forma e tamanho (Fig. 21, B).

Para as análises discriminantes das asas de fêmeas e machos também se obteve os mapas fatoriais que mostram a forma clara e a disposição de cada espécie, bem como as variações correspondentes de cada individuo (Figs.21 A e B). Como grupo externo *T. petrochiae* que está projetado junto às demais espécies.

Figura 20. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das cabeças de fêmeas (A) e machos (B) em relação à análise dos componentes principais. Os eixos representam os componentes 1 e 2

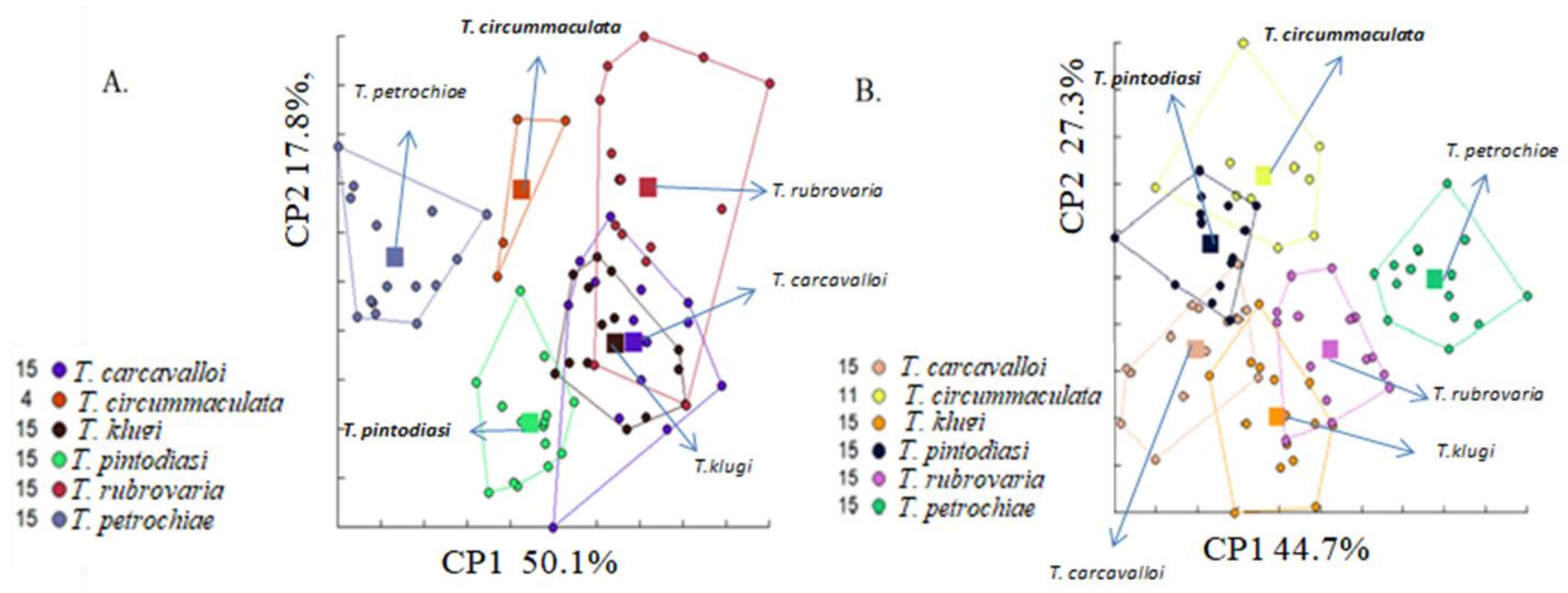
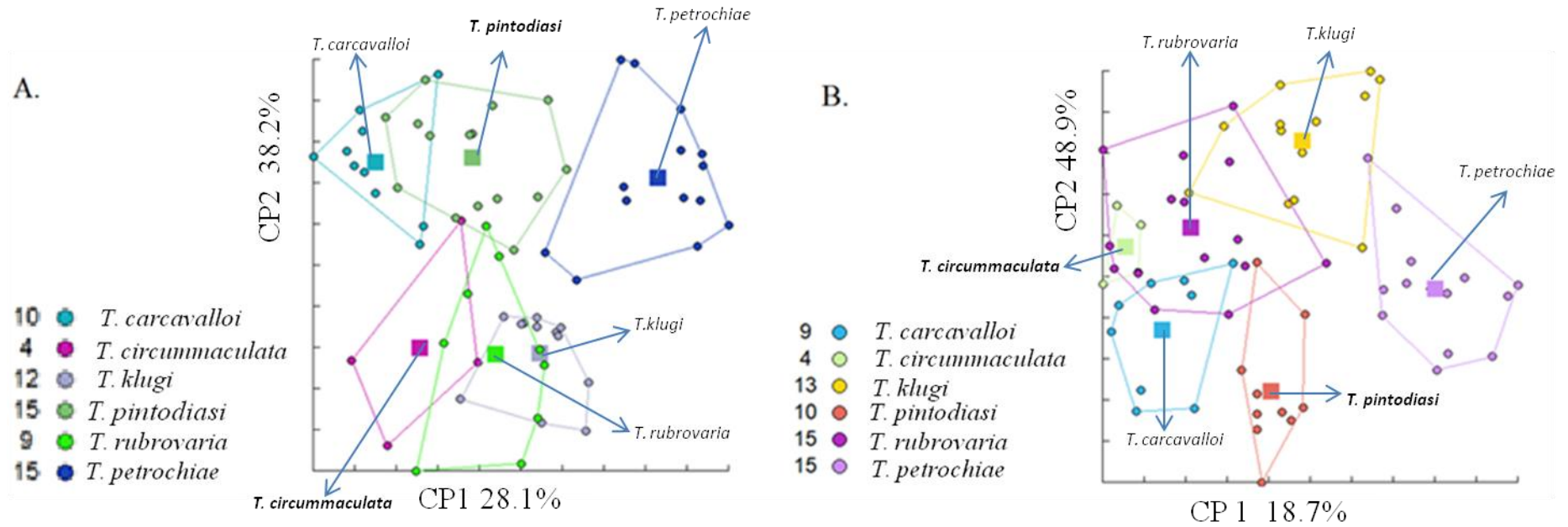


Figura 21. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das asas de fêmeas (A) e machos (B) em relação à análise dos componentes principais. Os eixos representam os componentes 1 e 2.



4.3.3 Dendogramas de similaridade morfométrica.

A partir das análises discriminantes foram gerados os dendogramas de similaridade morfométrica por meio dos valores de distância de Mahalanobis. Os dendogramas mostram que as espécies estudadas são relacionadas, percebe-se pela disposição de *T. petrochiae* junto de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*. Foi gerado dendogramas de cabeças de fêmeas e machos (Fig 22 A e B) e para as asas de fêmeas e machos (Figs 23 A e B) pode-se perceber a separação de *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* que são espécies próximas.

Figura 22. . Dendograma para cabeças de fêmeas(A) e machos(B) de *Triatoma carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

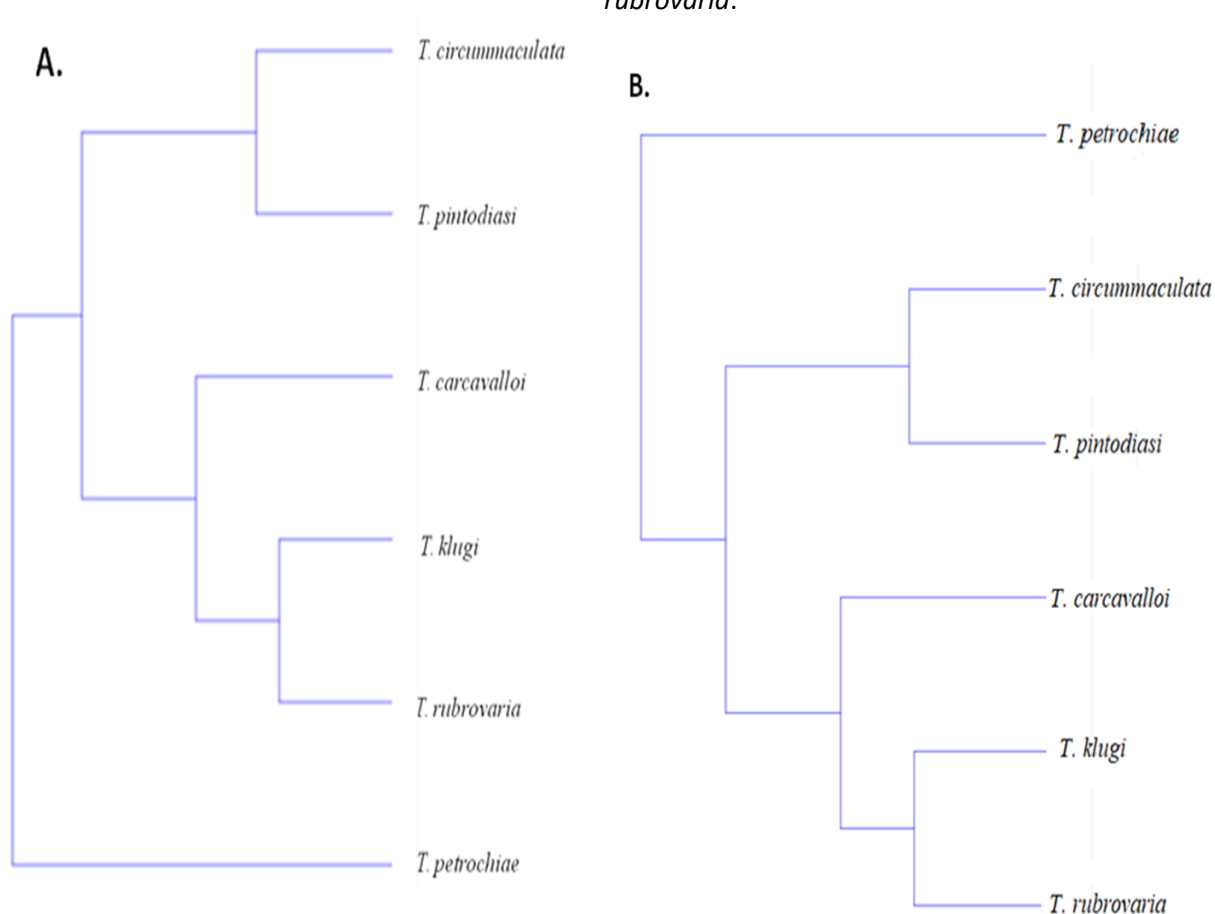
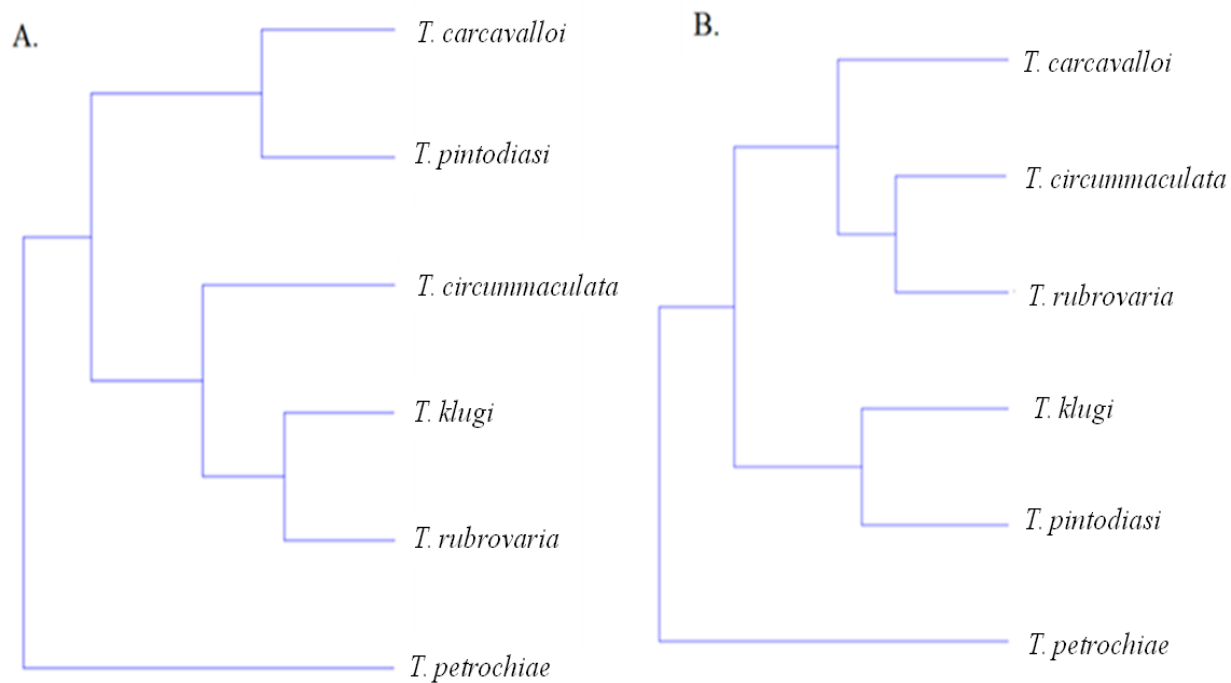


Figura 23. Dendograma para asas de fêmeas (gráfico A) e machos (gráfico B) de *Triatoma carcavallo*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

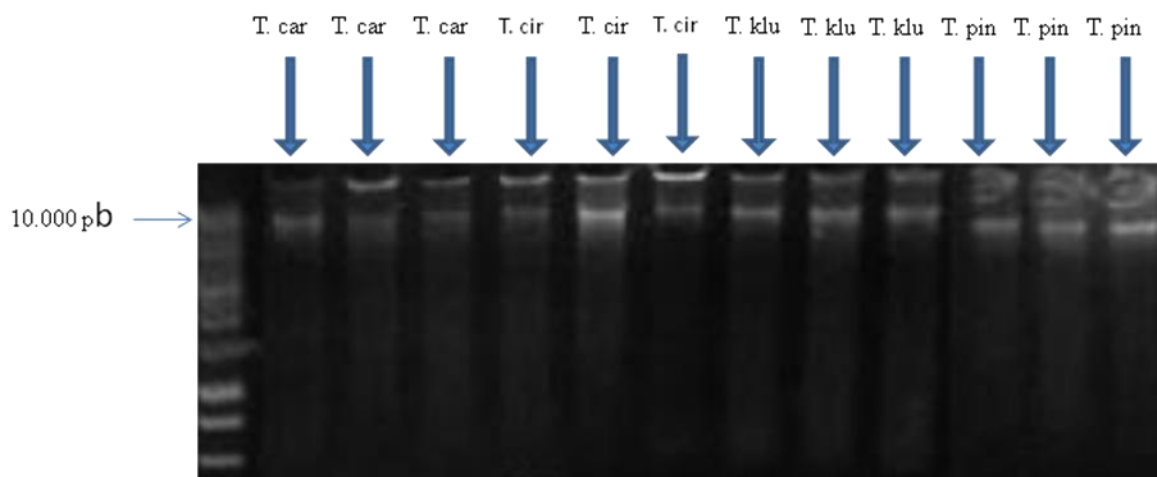


4.4. Estudos moleculares

4.4.1. DNA genômico de *T. carcavalloi*, *T. circummacula*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

A extração do DNA genômico de quatro espécies: *T. carcavalloi* (T. car), *T. circummaculata* (T. cir), *T. klugi* (T. klu) e *T. pintodiasi* (T. pin) do subcomplexo *T. rubrovaria*. Todas as espécies foram avaliadas em triplicata por eletroforese (Fig. 27). Os dados referentes a *T. rubrovaria* não estão representados, pois utilizou-se de análise de outro projeto executado na dissertação de Heloisa Pinotti <https://repositório.unesp.br/handle/1149/147061>. Observa-se que os DNA genômico contém em torno de 10.000 pares de bases (pb) o que indica que essas amostras contém quantidade de DNA suficiente para realização das ampliações.

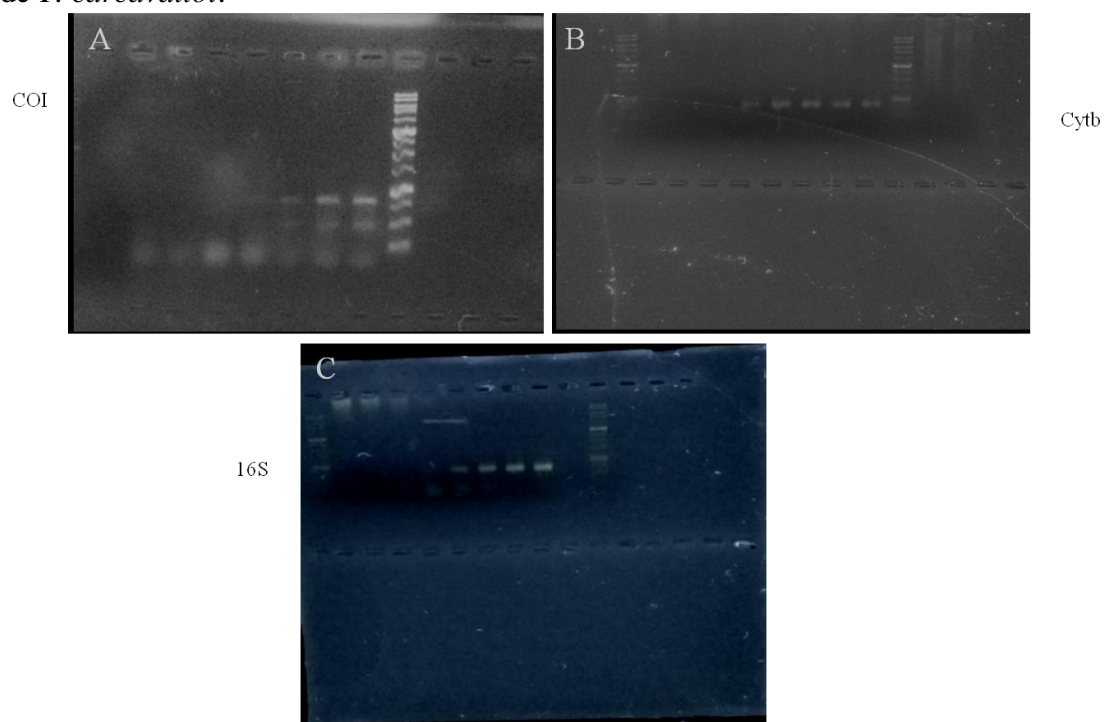
Figura 24. Gel de DNA genômico de *Triatoma carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi* e *T. pintodiasi*



4.4.2. Amplificação e sequenciamento dos fragmentos de gene

A amplificação dos fragmentos de gene por meio de PCR gerou em torno de 1000 a 750 pb para o COI, 750 pb para o Cyt b e 750 pb para o 16S, (Fig. 25, A, B e C). O sequenciamento recuperou respectivamente 587 pb, 692 pb, 542 pb para cada gene.

Figura. 25 Amplificações dos fragmentos COI, CytB e 16S detalhe dos géis de agarose de *T. carcavalloi*.



4.4.3 Alinhamento das sequências consensos dos fragmentos COI, Cytb e 16S

Observa-se o alinhamento das sequências consensos dos genes COI, Cyt b e 16S (Figs. 26, 27 e 28) das sequências de *T. carcavalloi*, *T. circummaculta*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*. Além de sequências inseridas no alinhamento para dar suporte aos resultados, tais sequências estão disponíveis no banco de dados-Genbank (Tab. 9).

Tabela 9. Código das sequências disponíveis no *Genbank* utilizadas na reconstrução filogenética. *T. rubrovaria* COI e *CytB*

Espécies	COI	Cytb	16S
<i>T. brasiliensis</i>	KJ580488	AY494170	AF021185
<i>T. delpontei</i>	FJ439768	KC249248	KC249001
<i>T. guasayana</i>	KC249342	KC249253	KC249012
<i>T. infestans</i>	HQ437704	HQ333233	EU143698
<i>T. patagonica</i>	-	-	AY035464
<i>T. platensis</i>	FJ811849	KC249274	KC249047
<i>T. rubrovaria</i>	-	-	KC249066
<i>T. sórdida</i>	KC249388	KC249292	KC249079
<i>P. megistus</i>	KC249312	KC249230	EU835979

Figura 26. Alinhamento das sequencias consenso do fragmento COI do DNA mitocondrial (587 pb).

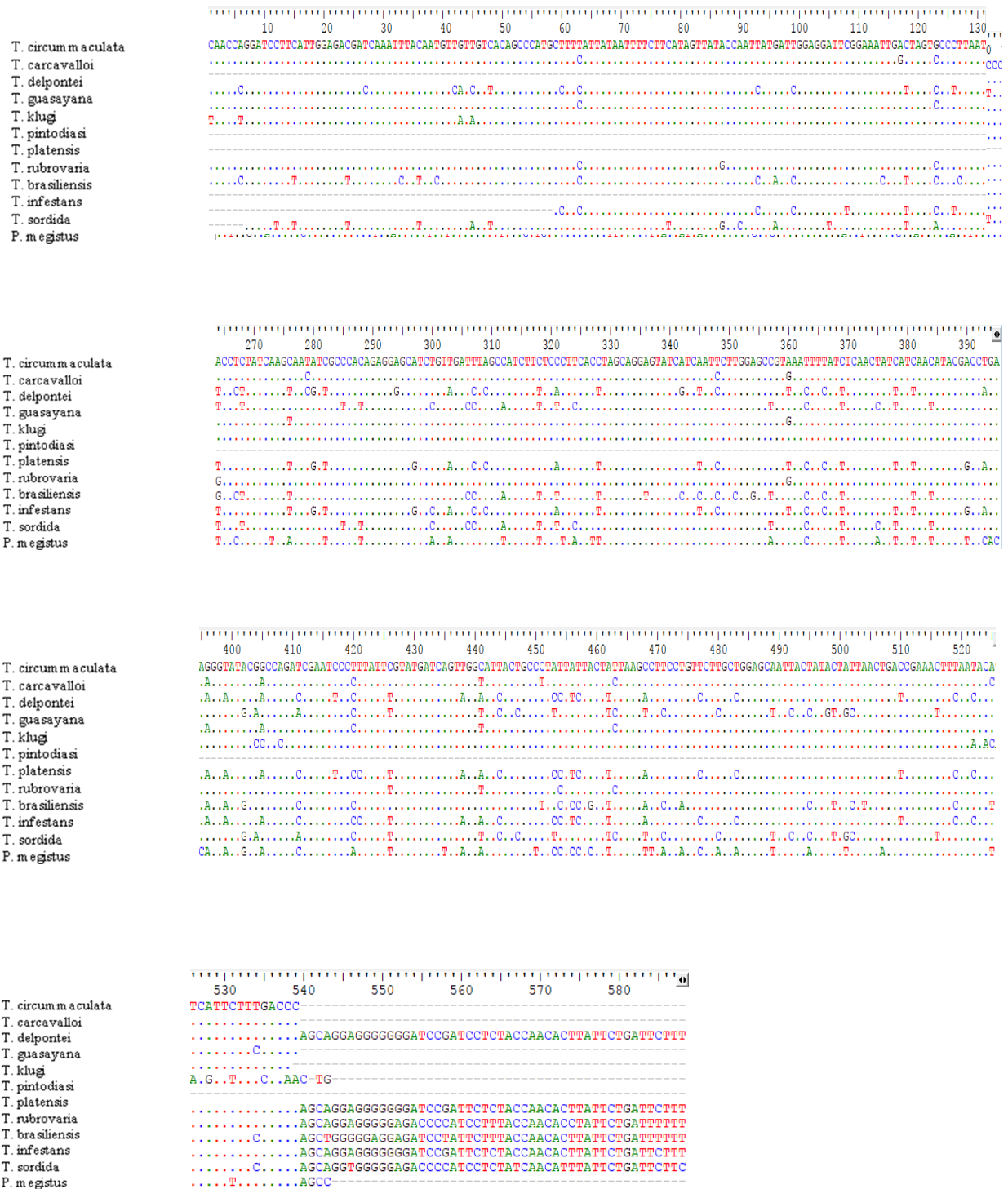


Figura 27. Alinhamento das sequencias consenso do fragmento Cytb do DNA mitocondrial (692 pb).

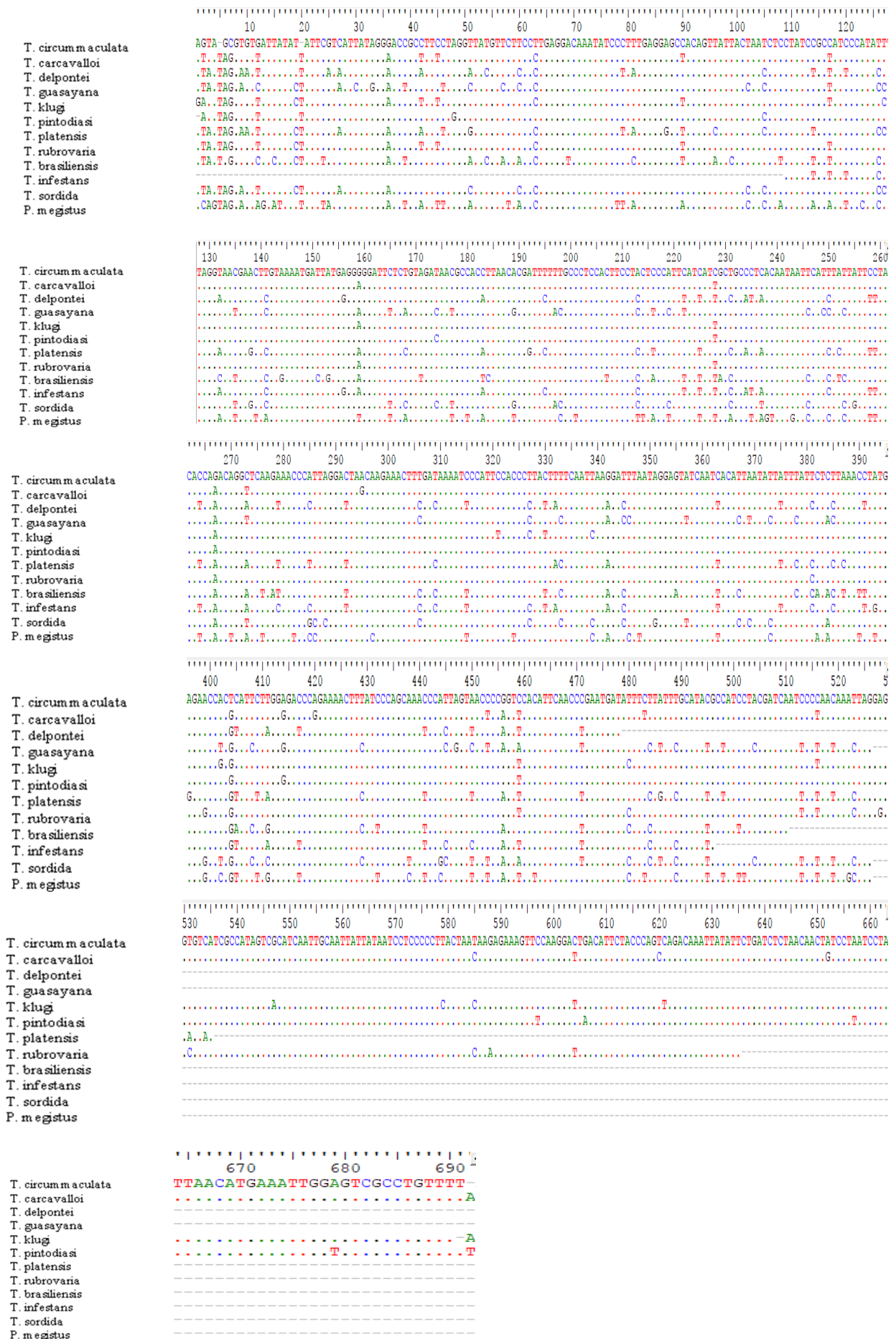
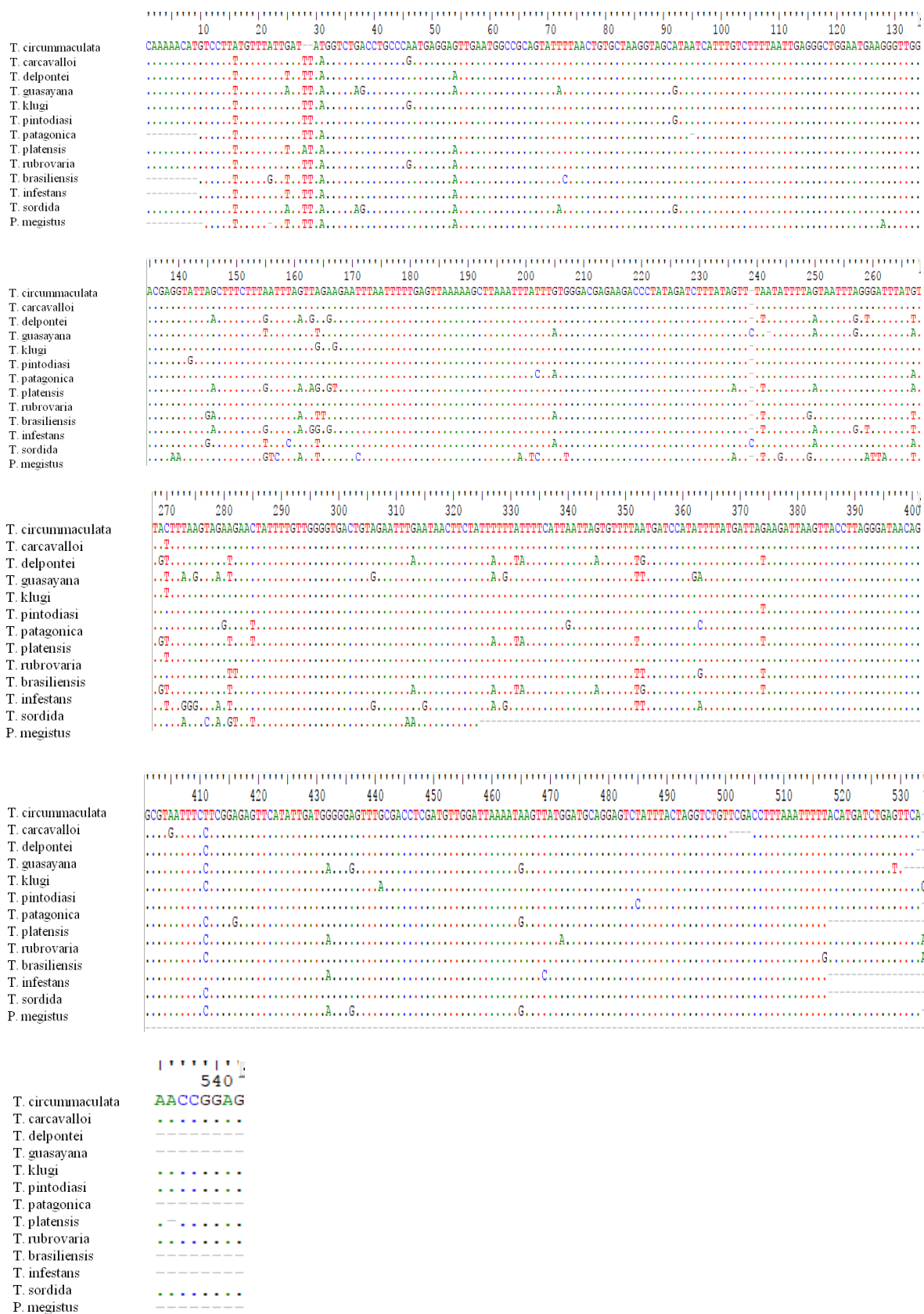


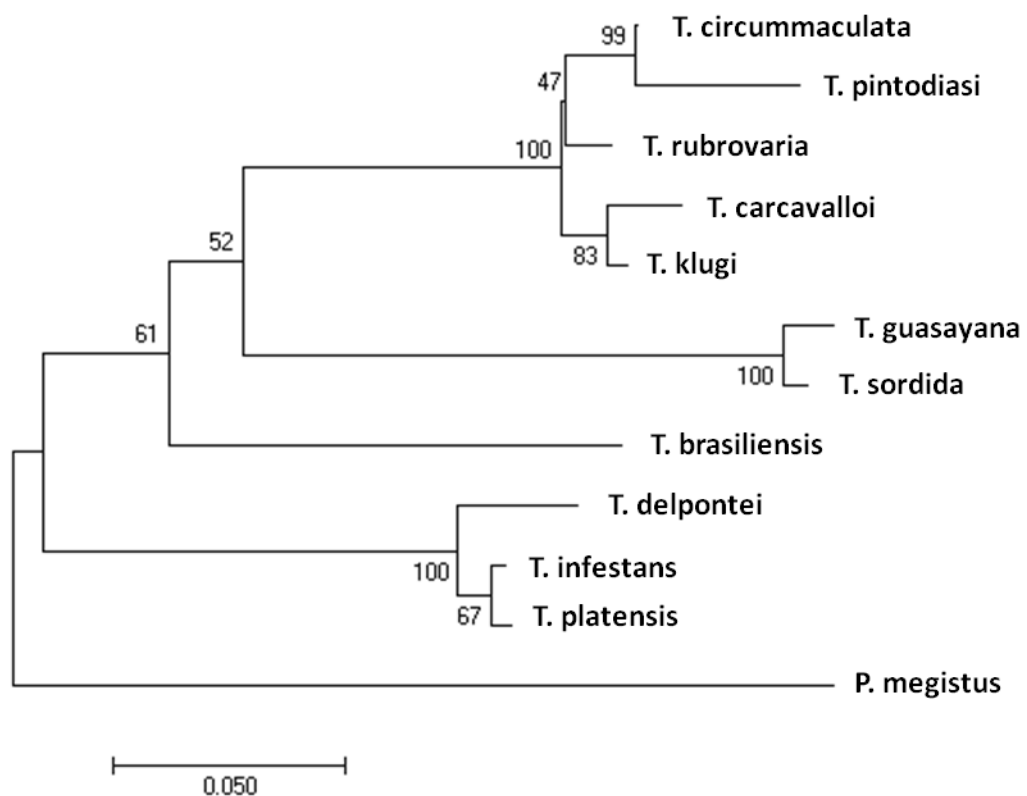
Figura 28. Alinhamento das sequencias consenso do fragmento16S (542 pb).



4.4.4 Dendogramas gerados com alinhamento das sequencias consensos

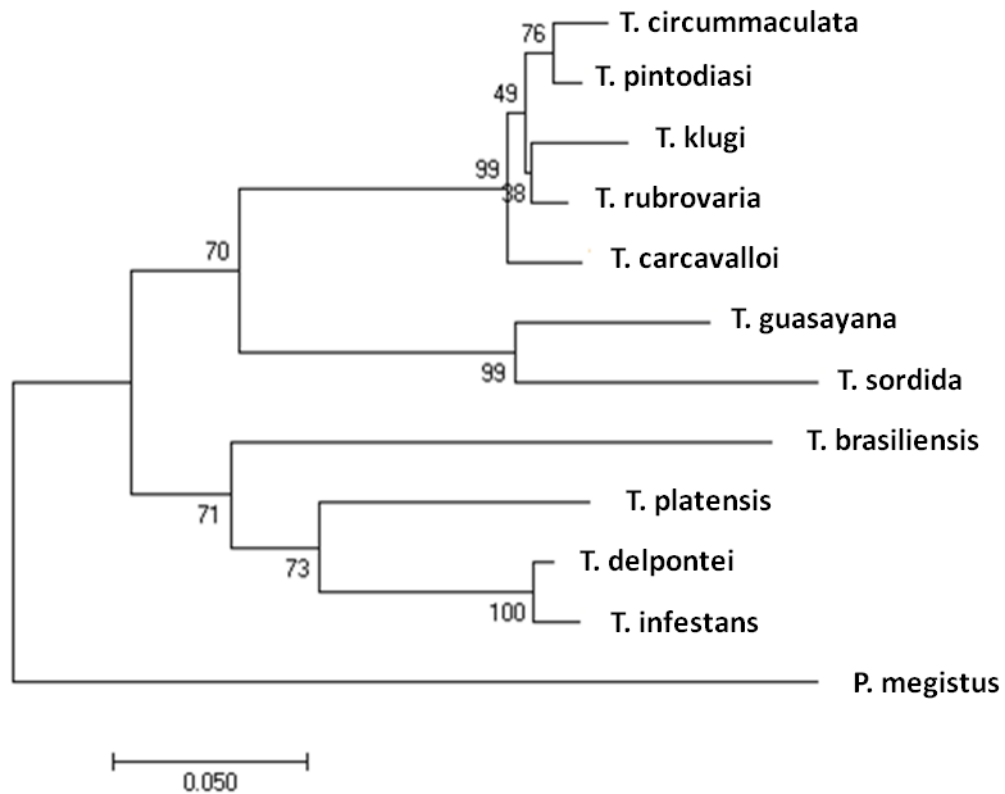
A árvore filogenética do gene COI foi gerada para 12 espécies, das quais cinco do subcomplexo *T. rubrovaria* e oito como grupo externo (Fig. 32). Ao avaliar o dendograma observa-se que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, espécies irmãs, se mantêm no mesmo clado e que *T. pintodiasi* possui uma taxa evolutiva de divergência maior que *T. circummaculata*, e ainda se pode observar que as cinco espécies mantêm o mesmo agrupamento observado na Figura 23.

Figura 29. Dendograma filogenético baseado no sequenciamento do fragmento de gene COI do DNA mitocondrial de 12 espécies de Triatominae



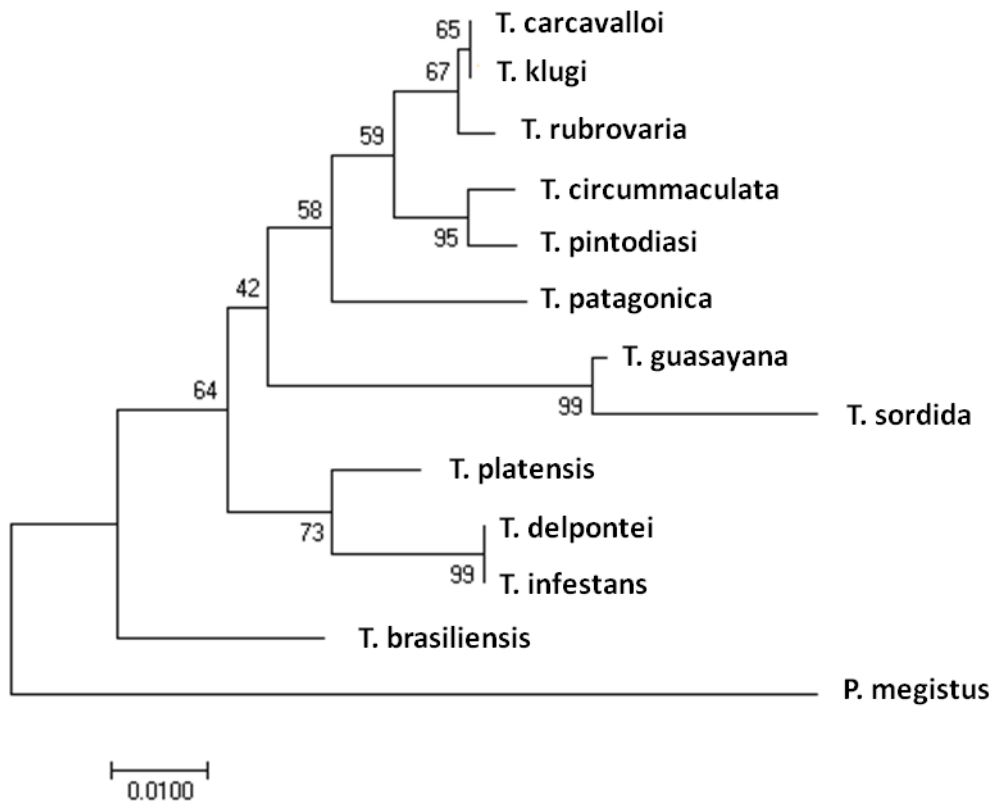
Para o gene *Cytb* foi inserida a mesma quantidade de espécies que gerou a árvore filogenética do gene COI. Foi observado que a taxa evolutiva de divergência de *T. pintodiasi* é menor quando comparada com *T. circummaculata* e que não houve mudança quanto ao agrupamento das cinco espécies estudadas. Tanto para os genes COI e *Cytb* as espécies de escolhas disponíveis no banco de dados Genbank foram necessárias para o enraizamento da árvore filogenética que gerou o dendograma por meio do modelo estatístico *Neighbor-joining* (Fig 33).

Figura. 30 Dendograma filogenético baseado no sequenciamento do fragmento de gene Cytb de 12 espécies de Triatominae



Ao avaliar o dendograma do gene 16S (Fig. 34) verifica-se que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* possuem a mesma taxa evolutiva de divergência, diferente dos resultados obtidos nos dendogramas gerados dos genes COI e Cytb (Figs. 26 e 27), onde as espécies estudadas se mantêm agrupadas. No entanto, foi observado que espécie *T. patagônica* esta inserida no agrupamento do subcomplexo *T. rubrovaria* e está próxima do clado de *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, sabendo que *T. patagônica* está inserida no subcomplexo sordida.

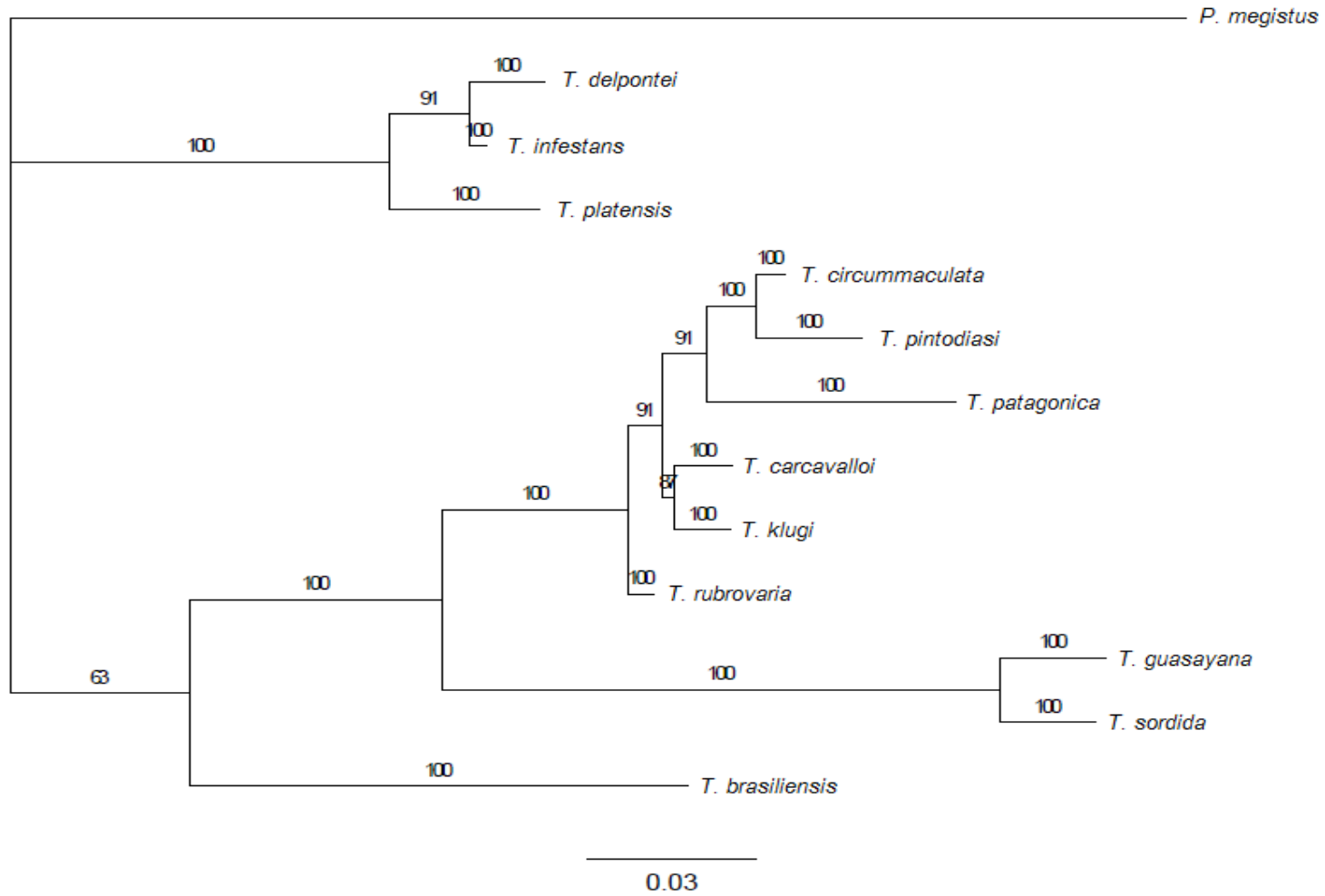
Figura 31. Dendograma filogenético baseado no sequenciamento do fragmento de gene 16S de 13 espécies de Triatominae



4.4.5 Análise Bayesiana

Foi realizada a análise bayesiana concatenada referente aos dados obtidos dos genes COI, Cytb e 16S que possibilitou criar uma árvore filogenética que mostra possíveis relações evolutivas entre *T. carvalhoi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*. Nessa árvore filogenética *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* mostram-se com distintas taxas de divergência. Verifica-se também que *T. patagonica* divergiu de uma ramificação do clado de *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*. É considerada do subcomplexo *T. sordida*. Em outro clado observa-se *T. carvalhoi* e *T. klugi* que apresentam a mesma taxa de divergência. Por sua vez *T. rubrovaria* surge de uma ramificação dos clados em que se inserem *T. circummaculata* com *T. pintodiasi* e *T. carvalhoi* com *T. klugi*. Esses resultados indicam que a análise bayesiana das cinco espécies são um grupo monofilético e confirmam que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* são espécies afins. Além de indicar que *T. patagonica* faz parte do subcomplexo *T. rubrovaria* (Fig. 32).

Figura. 32: Dendograma representativo da análise bayesina concatenada referente ao sequenciamento dos genes 16S, COI e Cytb.



5 DISCUSSÃO

Os estudos dos triatomíneos se fazem necessários de modo a compreender a biologia, a dispersão, a reprodução e os seus caracteres morfológicos. Assim pode-se contribuir com o controle vetorial, uma vez que os triatomíneos se constituem na principal via de transmissão de *T. cruzi* ao homem.

O subcomplexo *T. rubrovaria* foi proposto por Scholfield; Galvão, (2009) e compreende as seguintes espécies: *T. carcavalloei* Jurberg, Rocha e Lent, 1998; *T. circummaculata* (STAL, 1859); *T. klugi* CARCAVALLO et al. 2001; *T. limai* (DEL PONTE, 1929); *T. oliveirai* (NEIVA; PINTO; LENT, 1939), *T. rubrovaria* (BLANCHARD, 1843). *T. pintodiasi* Jurberg et al., (2013), foi considerada a sétima espécie desse subcomplexo.

Este trabalho estudou cinco espécies desse subcomplexo: *T. carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*. O estudo morfológico conduzido por microscopia eletrônica de varredura observou caracteres da cabeça, tórax e abdômen.

Na cabeça foram observadas diferenças entre as cinco espécies na disposição e tamanho dos ocelos, formato do clipeo e do anteclipeo (Fig. 9).

Na porção dorsal do tórax foram notadas diferenças entre as cinco espécies no pronoto, nas carenas laterais, nos tubérculos discal e nos escutelos (Figs.10, 11). Na porção ventral do tórax foram observadas diferenças no formato dos sulcos estridulatórios das cinco espécies (Fig. 12).

No abdômen foram examinadas as genitálias externas femininas das cinco espécies e foram percebidas diferenças quando examinadas pelas faces dorsais, posteriores e ventrais (Figs. 13, 14, 15). Assim este estudo confirma as observações de Rosa et al. (2010, 2012, 2014) que verificaram que a genitália externa feminina tem validade taxonômica.

Desse modo foram feitas contribuições para a distinção fenotípica de cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, notadamente entre *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, que permaneceram como espécies únicas por 159 anos. Jurberg et al., (2013) ao descreverem *T. pintodiasi* registraram diferenças morfológicas entre o comprimento dos quatro segmentos da antena, largura umeral do pronoto, largura do abdômen e genitália masculina: parâmeros, processo do endosoma, suporte do falosoma e vesica. Neste estudo foram observados outros caracteres diferenciais localizados na cabeça,

tórax e abdômen entre *T. circummaculata* e *T. pindiasi*, dessa forma 10 caracteres de diagnósticos de análises morfológicas foram fundamentais para fortalecer a diagnose entre essas duas espécies, tais como, ocelos, carenas laterais, processo apical do escutelo, sulco estridulatório, genitalia externa feminina vista dorsal linha que divide o VII e VIII segmento do tergito e o formato do IX segmento do tergito por vista dorsal e ventral. Portanto em publicações importantes como de Obara et al., (2007) Santos- Mallet et al., (2008); Souza et al., (2016); Rivas et al.,(2017); Rosa et al., (2017a; 2017b), no entanto comparando com os estudos desses autores citados anteriormente pode se confirmar o quanto foi eficaz, os estudos morfológicos por meio de microscopia eletrônica de varredura para cinco as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*.

Embora tenham descrito diferenças morfológicas entre *T. circummaculata* e *T. pindiasi* Jurberg et al., (2013) referem que as duas são espécies crípticas. Portanto, diante das diferenças morfológicas observadas neste estudo e da afirmação de Galvão, 2014, que considera espécies crípticas como aquelas que são indistinguíveis morfológicamente pode-se afirmar que *T. circummaculata* e *T. pindiasi* são espécies irmãos.

A avaliação estatística do estudo morfométrico de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pindiasi* e *T. rubrovaria* indica que essas espécies apresentam diferenças entre elas (Tab. 9). Por essa avaliação *T. circummaculata* e *T. pindiasi* apresentam dois parâmetros com mensuração média idêntica (distância externa entre os olhos e terceiro segmento da probóscide) e *T. klugi* e *T. rubrovaria* um parâmetro (terceiro segmento da probóscide) (Tab. 9). A mesma avaliação estatística feita para os machos das cinco espécies indicou também dois parâmetros semelhantes entre *T. circummaculata* e *T. pindiasi* (distância externa entre os olhos e segundo segmento da probóscide) e três entre *T. klugi* e *T. rubrovaria* (primeiro, segundo e terceiro segmentos da probóscide) (Tab. 11).

Por sua vez as análises de variância ($P < 0.05$) das mensurações de 14 parâmetros de cabeça, tórax e abdômen de fêmeas de *Triatoma carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pindiasi* e *T. rubrovaria* indicou que entre *T. circummaculata* e *T. pindiasi* somente dois parâmetros apresentam diferenças morfométricas significativas (distância entre os ocelos e primeiro segmento da probóscide) (Tab. 10). De outra forma essa análise para os machos indicou também que entre *T. circummaculata* e *T. pindiasi* apenas dois parâmetros são significativos

(primeiro e terceiro segmentos da probóscide). Entre machos de *T. carcavalloi* e *T. circummaculata*, *T. circummaculata* e *T. klugi* e entre *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* todos os 14 parâmetros apresentaram diferenças morfométricas significativas (Tab. 12).

O desenvolvimento do estudo morfométrico e as avaliações estatísticas tiveram por base os estudos conduzidos Dujardin et al., 1999 que verificaram o dimorfismo sexual de *R. domesticus* e a monografia de Lent; Wygodzinsky, (1979) para as mensurações de tórax e abdômen.

Segundo estudos realizados por Dos- Santos e colaboradores no ano de 2003 ao mensurar 13 parâmetros de cabeças de 14 espécies de *Pantrogylus megistus* das quais respectivas análises mostraram que é possível separar as espécies desse gênero por morfometria clássica e estudos conduzidos por Nattero et al 2017 ao estudar a variabilidade morfométrica de espécies do subcomplexo *T. sordida* fortalece essa confirmação de que ao servi-se de morfometria é possível distinguir espécies de um subcomplexo. No presente estudo ao estudar a variabilidade entre morfométrica entre as cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* essa ferramenta mostrou ser uma excelente para separar *T. carcavalloi* e *T. circummaculata*, *T. circummaculata* e *T. klugi* e entre *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*. Entretanto quando são comparadas as espécies irmãs *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, a os resultados mostram que a morfométrica não é suficiente para separar essas duas espécies.

Gurgel-Gonçalves (2008) relatam a importância que a morfometria geométrica adquiriu nos últimos anos, devido a essa percepção essa metodologia foi incluída neste estudo, por acreditar nos valiosos resultados que proporcionariam para ao estudo das cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*.

Diversos autores como Dujardin et al., (1999), Jaramillo, Castillo e Wolf, (2002), Dujardin, Beard e Ryckman (2007), Gurgel-Gonçalves et al. (2008), Aldana (2011), Oliveira et al. (2017) serviram-se dessa metodologia para diferentes abordagens de estudo de asas e cabeças de triatomíneos. Essa metodologia ofereceu respostas para entender o dimorfismo sexual de espécies e para verificar diferenças entre espécies ditas crípticas que não se distinguem por morfometria clássica e por dados morfológicos. Assim a morfometria geométrica também é útil para revalidar e descrever novas

espécies de Triatominae (Abad-Franch et al., 2013; Rosa et al., 2012; Jurberg et al., 2013; Mendonça et al., 2016; Souza et al., 2016).

Para o estudo de morfometria geométrica, além de utilizar as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, que no Brasil são restritas ao estado do Rio Grande Sul, foi utilizada como grupo externo *T. petrochiae*, pois a espécie foi caracterizada por meio de morfometria geométrica recentemente em um estudo de espécies do sub complexo *T. brasiliensis* (OLIVEIRA et al., 2017). A escolha dessa espécie se deu também em razão do comprimento da cabeça, pois a mesma é mais alongada que a cabeça de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, desse modo não houve a necessidade de se utilizar de outro gênero de Triatominae. Entretanto as diferenças observadas nas asas, não foram tão marcantes quanto às apresentadas para a cabeça.

Ao avaliar os dados obtidos pela morfometria geométrica da cabeça das cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* verificou-se que o tamanho médio do centroide, as análises discriminantes e o dendograma de similaridade morfométrica mostraram o agrupamento entre as cinco espécies. Portanto *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* (Fig. 20 A e B) para cabeças de fêmeas essas duas espécies se separam, mas para cabeça de machos não separam, no entanto para as asas quanto a disposição dos mapas fatoriais entre machos e fêmeas mostram que as duas espécies se separam mesmo o número de asas para cada espécie variarem, (Tab.3 e Fig. 21 A e B). Pode ser notado no dendograma de similaridade morfométrica que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* para cabeça de fêmeas e machos são próximas para o dendograma de similaridade morfométrica de asas essas duas espécies se distanciam. (Figs. 22 A e B; 23 A e B)

A escolha das espécies para os estudos moleculares foi baseada nos estudos de Scolfield; Galvão, 2009 que estabelecem que o gênero *Triatoma* é constituído por oito complexo e oito subcomplexos, embora esse quantitativo tenha sido modificado para nove subcomplexos por Alevi et al., (2017), que propôs o subcomplexo *T. vitticeps*. Dessa forma *T. delpontei*, *T. infestans* e *T. platensis* fazem parte do subcomplexo *T. infestans*, por sua vez *T. guasayana*, *T. sordida* e *T. patagonica* do subcomplexo *T. sordida* constituído por quatro espécies. Para as espécies estudadas, ficou estabelecido como grupo externo, *T. brasiliensis* e *P. megistus*. Ainda foram escolhidas como grupo

externo *T. delpontei*, *T. infestans*, *T. platensis*, embora essas três espécies ocorram no estado do Rio grande do Sul, não há relato de simpatria com as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, embora se encontram em ecotopos similares. A espécie *T. sordida* foi escolhida por estar relacionada ao subcomplexo *T. rubrovaria*

Ao avaliar os dendogramas obtidos para os genes COI e *Cyt b* verifica-se o agrupamento de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi*, e *T. rubrovaria*. Para o fragmento COI, *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* mantem-se no mesmo clado e *T. circummaculata* apresenta uma taxa evolutiva de divergência menor (Fig. 29). No dendograma referente ao *Cyt b* às duas espécies também estão inseridas no mesmo clado, porém a taxa evolutiva é maior para *T. pintodiasi* (Fig. 30). Alevi e colaboradores no ano de (2017) ao utilizar o gene 16S confirma o estado específico da espécie *T. pintodiasi* no subcomplexo *T. rubrovaria*, entretanto sinalizam que é necessário acrescentar mais genes para tal confirmação, no presente estudo realizado com as cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, utilizando os três genes COI, *Cyt b* e 16S foi possível confirmar que *T. pintodiasi* esta inserida no subcomplexo *T. rubrovaria*. Ainda para o gene 16S obteve-se um novo resultado ao utilizar a sequência de *T. patagonica* disponível no banco de dados Genbank, no qual Pita et al., (2016), indica que é possível *T. patagonica* e *T. guasayana* estarem inseridas no subcomplexo *T. rubrovaria*, nos resultados esperados *T. guasayana* se mantém no subcomplexo *T. sordida* e *T. patagonica* se agrupa com as cinco espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* entretanto novamente para se confirmar tal estado é necessário utilizar mais genes levando em conta que no presente estudo conduzido com as cinco espécies foram utilizadas apenas sequências do gene 16S. Quanto à espécie *T. patagonica* no qual possui uma taxa divergência maior comparada a *T. circummalata* e *T. pintodiasi* (Fig. 31) Por meio de análise bayseana foi possível concatenar o dados e construir a árvore filogenética (Fig. 32), que proporciona robustez aos dados gerados a partir dos fragmentos COI, *Cyt b* e 16S.

Considera-se válido este trabalho, pois foram executados estudos morfológicos, morfométricos e moleculares do subcomplexo *T. rubrovaria*, que confirmaram a identidade específica de cinco espécies, assim como sustentaram serem constituintes desse subcomplexo. Além de ampliar o número de caracteres que confirmam *T. pintodiasi* como válida, após sua separação de *T. circummaculata* feita por Jurberg et al.

2013. Frisa-se também que durante as coletas feitas em 2016 em 14 localidades de sete municípios do estado do Rio Grande do Sul, a ocorrência de *T. pintodiasi* foi maior que a de *T. circummaculata*. Assim, ao realizar um levantamento bibliográfico pode-se notar que em alguns artigos, dissertações, teses e monografias, o que os autores consideraram como *T. circummaculata*, poderia ser *T. pintodiasi*.

No decorrer das análises morfológicas, morfometria clássica e geométrica foram observadas similaridades quanto aos caracteres de *T. klugi* e *T. rubrovaria*, os ocelos na região da cabeça não se diferenciam, no pronoto vista dorsal, as carenas laterais e submedianas são basicamente indistinguíveis e por vista ventral na genitália feminina o gonocoxito 8 entre as duas espécies possuem basicamente o mesmo formato. Na morfometria clássica de *T. klugi* e *T. rubrovaria* de fêmeas, o diâmetro dos olhos, a região pós - ocular, distância entre os ocelos e largura do abdômen não tem diferenças entre as médias, assim como para os machos das duas espécies, o diâmetro dos olhos, distância entre os ocelos, 1º, 2º e 3º da proboscide e largura do abdômen não houve significância entre as médias. Ao passo que foi avançando as comparações entre as duas espécies, notando-se a morfometria geométrica, nos mapas fatoriais tanto para as cabeças e as asas de fêmeas e machos, na projeção dos mapas fatoriais, observou-se que ambas as espécies não se separam, assim, permanecem agrupadas. Já para o dendograma de similaridade morfométrica os resultados mostram a proximidade de *T. klugi* e *T. rubrovaria* para os dendogramas de fêmeas e machos de cabeças e o dendograma de asas de fêmeas. Essas considerações chamam atenção levando em conta que diversos estudos foram conduzidos quanto à variabilidade cromática da espécie *T. rubrovaria* o que se torna confuso identificar essa espécie restrita ao estado do Rio Grande do Sul, necessitando de estudo bem específicos, portanto diante de tantas similaridades de caracteres morfológicos, parâmetros morfométricos e morfometria geométrica fica difícil distinguir *T. klugi* de *T. rubrovaria*, portanto, na biologia molecular é evidente que essas duas espécies se separaram, quanto a árvore filogenética gerada por meio dos genes *Cyt b* e para árvore gerada com os três genes concatenados *Cyt b*, COI e 16S.

6 CONCLUSÕES:

- Por meio de microscopia eletrônica de varredura foram descritos caracteres da cabeça, tórax e abdômen que possibilitaram a distinção de *Triatoma carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* que integram o subcomplexo *T. rubrovaria*.
- As análises morfométricas de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdômen possibilitaram a distinção de *Triatoma carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* que integram o subcomplexo *T. rubrovaria*.
- As análises morfométricas de dois caracteres da cabeça de fêmeas e de dois caracteres da cabeça de machos permitiram distinguir *T. circummaculata* de *T. pintodiasi*.
- A análise por morfometria geométrica do tamanho do centroide, da análise discriminante e do dendograma de similaridade morfométrica indicam que *T. carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* formam um agrupamento.
- As análises dos genes mitocondriais COI, *Cyt b* e do gene ribossomal 16S, indicam que *Triatoma carcavalloei*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* constituem um subcomplexo.
- *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, embora distintas, são espécies irmãs.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH et al., *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 108, supl. 1, p. 92-99, 2013.
- ALDANA, E. et al., Análisis morfológico de *Panstrongylus geniculatus* de Caracas, Venezuela. **Biomédica**, v. 31, n. 1, p. 108-117, 2011.
- ALEVI, K. C. C.; GUERRA, A. L.; IMPERADOR, C. H. L.; JURBERG, J.; MOREIRA, F. F.F., OLIVEIRA, M.T. V. A. Mitochondrial Gene Confirms the Specific Status of *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha, and Rocha, 2013 (Hemiptera, Triatominae), an Endemic Species in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 96 n.1, p. 200-201, 2017.
- ALEVI, K. C. C.; OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, M.T. V. A.; ROSA, J. A. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. **Parasites & Vectors**, v. 10, p.180, 2017.
- ALMEIDA, C. E.; VINHAES M. C.; ALMEIDA, J. R.; SILVEIRA, A. C.; COSTA, J. Mem. Monitoring the Domiciliary and Peridomiciliary Invasion Process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95 n.6 Rio de Janeiro Nov./Dec. 2000.
- ALMEIDA, C. E.; PACHECO R. S.; NOIREAU, F.; COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: Isoenzymatic and Chromatic Patterns of Five Populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 829-834, September 2002.
- ALMEIDA, C. E.; RAMOS, E. F.; SOUZA, R. A.; MAGNO-ESPERANÇA, G.; PACHECO, R. S.; COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae- Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100 n.3, p. 231-235, 2005.

ALMEIDA, C. E.; MARCET, P. L.; GUMIEL, M.; TAKIYA, D. M.; ALMEIDA, M. C.; PACHECO R. S.; LOPES, C. M.; DOTSON, E. M.; COSTA, J. Phylogenetic and Phenotypic Relationships Among *Triatoma carcavalloei* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species Collected in Domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.34 n.2, p. 164-173. 2009.

ALMEIDA M. C et al., Biology of *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 under laboratory conditions. **Ver. Soc.Bras. Med.Trop**, v. 47 n.3, p. 307-312, 2014.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro**, 2008.

ARAS, R.; GOMES, I.; VEIGA, M.; MELO, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2003.

BARATA, J. M. S. Macroscopic and exocorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). **Atlas of Chagas disease vectors in the Americas**, v. 2, p. 409-448, 1998.

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

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Ent. y Vecs**, v.7, sulp 1, junho 2000.

CARCAVALLO, RU.; JURBERG, J.; LENT, H.; GALVÃO, C.; STEINDEL, M.; PINTO, C. J. C. Nova Espécie do Complexo oliveirai (Nova Denominação para o Complexo matogrossensis) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96 n.1, p. 71-79, January, 2001

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

COURA, J. R. Chagas disease: What is known and what is needed a background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, supl. 1, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 00-00, 2014.

DI PRIMO, P. Atual distribuição geográfica dos triatomídeos e seus índices de infecção no Rio Grande do Sul. **An Fac Med Porto Alegre**, v. 17, p. 17-37, 1957.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23 (supl.1), 2007.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 375-379, 2011.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop, Uberaba** , v. 31, n. 4, Aug. 1998.

DOS SANTOS-MALLET, J. R.; ALMEIDA, M. C.; NOVO, S. C., GONÇALVES, T. C. M. Morfologia externa de *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera:

Reduviidae: Triatominae) através da microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. **Ent. Brasilis**, v. 1, n. 2, p. 37-42, 2008.

FOLMER, O et al, DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

DUJARDIN, J. P.; STEINDEL, M.; CHAVEZ, T.; MACHANE, M.; SCHOFIELD, C. J. Changes in the Sexual Dimorphism of Triatominae in the Transition from Natural to Artificial Habitats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94 n. 4 p. 565-569, Jul./Aug. 1999.

D'Orbigny, G Bibron. Voyage dans l'Amérique Méridionale, Tome 5, 1re Partie: Reptiles A - P. Bertrand, Strasbourg, Ve **Paris: Levrault, 1837.**

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 14, p.3, 1980.

GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil*: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-788598203096.pdf>. Acesso 08/06/2015.

GURGEL-GONÇALVES, R.; ABAD-FRANCH, F.; FERREIRA, J. B. C.; B. SANTANA, D.; A. CUBA, C. Is *Rhodnius Prolixus* (Triatominae) Invading houses in central Brazil? **Acta Trop.** v. 107, p. 90-98, 2008.

GONÇALVES, R.G. **Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil.** Universidade de Brasília: UNB, 2008. 212p, Tese (Doutoramento em Ciências da Saúde)- Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

JURBERG, J.; ROCHA, D. S.; LOROSA, E. S., VINHÃES, M.; LENT, H. Uma nova espécie de *Triatoma* do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera Reduviidae). **Ent y Vec**, Rio de Janeiro v. 5 n.6, p. 295 – 310, Nov. / Dez. 1998

JURBERG J. Ferramentas usadas em Taxonomia de Triatomíneos, o uso múltiplo. **Entomol y Vect**, v. 10, p. 497-509, 2003.

JURBERG, J et al. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. of the *Triatoma rubrovaria* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde** v. 4, p.43–56, 2013.

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

LOROSA E. S. et al., Hemolinfa de dictioptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol Vect** v.7, p. 287-296. 2000

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

MELLO, F.; FIGUEIREDO, M. I. O. **Guia de identificação de triatomíneos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: CORAG, 2013.

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

MONTEIRO, F. A. et al. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 4, p. 997-1006, 2003.

NATTERO, J et al. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae):evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. **Parasites & Vectors**, V. 10 p. 412, 2017.

NEVES, S. C. T., et al. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil. 2012

NÓBREGA, A. A., et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 653, 2009.

OBARA, M T.; ROSA, J. A.; JUNIOR W. C.; URBINATTI, P. R.; QUINTERO, L. O.; BARATA, J. M. S.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. A study of the scutellum in eight Chagas disease vector species from genus *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) using optical and scanning electron microscopy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.4, p. 463-468, 2007.

OLIVEIRA, J., et al. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *triatoma brasiliensis* species complex and the brasiliensis subcomplex. **Acta Trop.** V. 170, p.140-148, 2017.

PACHECO, R. S., et al. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. **Parasite**, v.14, p. 231–237, 2007.

PITA, S.; LORITE, P.; NATERRO, J.; GALVÃO, C.; ALEVI, K.C.C.; TEVES, S.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; PANZERA, F. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera- Triatominae). **Infec Gen Evol**, v.43, p. 225-231, 2016.

POINAR JR, George. *Triatoma dominicana* sp. n.(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n.(Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association. **Vector-Borne & Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 1, p. 72-81, 2005.

POINAR JR, G.. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n.(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. **Palaeodiversity**, v. 6, p. 1-8, 2013.

POSADA, D. JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, P. 1253–1256, 2008.

PRIOTTO, et al. Aspectos da vigilância entomológica da doença de chagas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ver. Pat. Trop.** v. 43, n. 2, p. 228-238, 2014.

Rivas, N.; Sánchez- Cordeiro, V.; D Camacho, A.; Córdoba-Aguilar, A.; Alejandre-Aguilar, R. Morphological and morphometric analysis of scutella of six species and two subspecies of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. **Journal of Vector Ecology**, V. 42, n. 2, 2017.

ROCHA, M. O; TEIXEIRA M. M.; RIBEIRO A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 5, p. 727 – 743, 2007.

ROSA, J. A. et al. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 28, n. 4, p. 363-375, 1999.

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

ROSA, J. A D., TRES, D. F. A., SANTOS, J. L. F., & BARATA, J. M. S Estudo morfométrico dos segmentos antenais de ninfas e adultos de duas colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)(Hemiptera: Reduviidae). **Ent y Vec**, v. 7, p. 255-264, 2000.

ROSA, João Aristeu da et al. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 286-292, 2010.

ROSA, J. A et al. Description of *Rhodnius montenegrensi* ssp.n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia Brazil. **Zootaxa** 3478, 62–76, 2012.

ROSA et al. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy **Parasites & Vectors**, v.7, p.17, 2014.

ROSA J. A. et al. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) **ZooKeys** 675: 1-25, 2017a.

ROSA, J. A., ET AL. Third Record of *Rhodnius amazonicus* and comparative study with *R. pictipes* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Acta Trop**, v. 176, p. 364-372 2017.

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

SANTOS, C. M.; JUBERG, J.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. S.; FERNANDEZ J. I. R. Estudo morfológico do gênero *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.98 n.7 2003.

SCHOFIELD C. J. Biosystematics of the Triatominae. In: SERVICE, M.W. (Ed.). **Biosystematics of Haematophagous Insects**. Oxford: Clarendon Press, 1988. p. 281-312.

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

SILVA, I.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. I. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Goiana Med**, 31: 1-37, 1985

SOUZA, E. S. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. **ZooKeys**, v. 621, p. 45–62, 2016.

STAL,C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. **Berliner Entomologische Zeitschrift**, v. 3, p. 99-117, 1859.

STEINDEL, Mário 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. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

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

WEIRAUCH, C.; MUNRO, J. B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (hemiptera: reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Molecular phylogenetics and evolution**. v. 53, p. 287-299, 2009.

WHO – World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: Março de 2017.