

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/01/2020.

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.

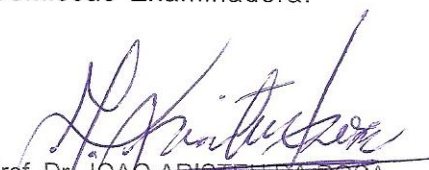
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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. carcavalloei</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. carcavalloei</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 carcavalloei</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. carcavalloei</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 carcavalloei</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).

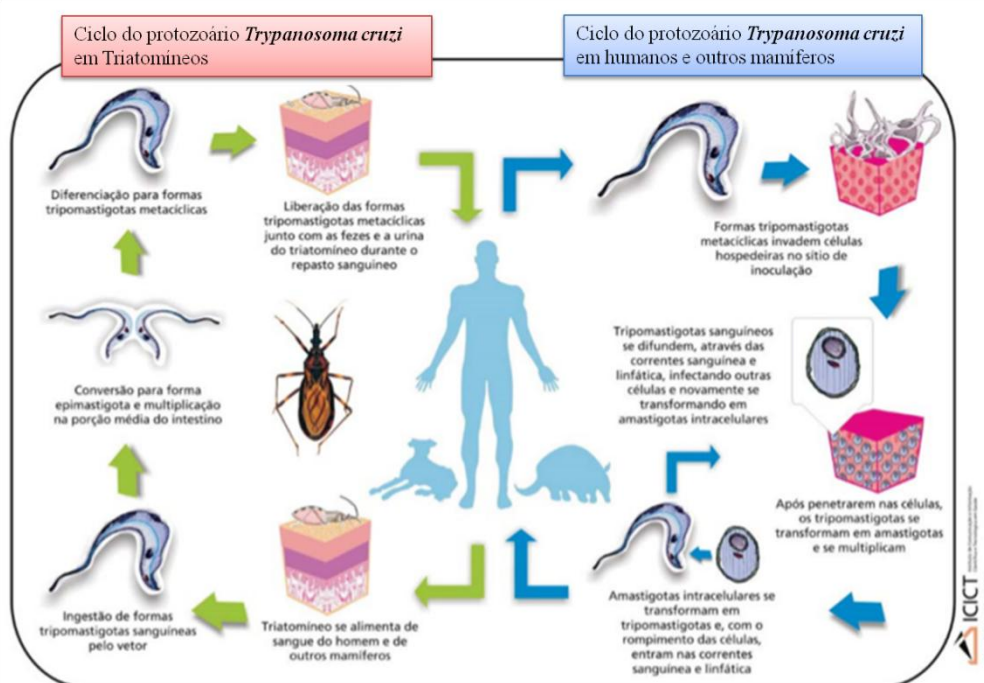
A doença de Chagas, descrita inicialmente como tripanossomíase americana, ocorre principalmente em 21 países da América Latina com caráter endêmico, devido à distribuição do vetor e dos reservatórios, que são mamíferos silvestres (VINHAES; DIAS, 2000; COURA; DIAS, 2009; WHO, 2017). Devido ao aumento 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 as mesmas 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.

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 morfométrico 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.

JUBERG, 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.