



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



SUELI GARDIM

**Relação filogenética entre sete espécies de Triatominae
(Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil
baseada no sequenciamento de genes mitocondriais.**



ARARAQUARA
2010

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

Relação filogenética entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais.

SUELI GARDIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

ARARAQUARA
2010

A Dissertação de mestrado apresentada foi desenvolvida sob orientação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa no Laboratório de Parasitologia, em parceria com a Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular, ambos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - Campus Araraquara.

Dedico este trabalho aos meus
pais, Rubens e Nilce...

Agradecimentos

Agradeço pela vida:

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde, força e sanidade durante o desenvolvimento desse trabalho....

Agradeço ao meu pai, Rubens Paulo Gardim, à minha mãe, Nilce Aparecida Florio Gardim, e às minhas irmãs, Nanci Gardim e Marli Gardim, pela paciência, amor e carinho incondicionais.

Agradeço a meus familiares (tios, primos e avós), que apesar de nem sempre estarem presentes, sempre me incentivaram e apoiaram.

Agradeço aos melhores amigos do mundo:

Agradeço ao super companheiro Paulo Vitor Esposto Curti (o "Mor") pelo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade e paciência.

Agradeço aos inseparáveis: Hebert Quadrado, Marco Aurélio Rodrigues e Pedro Luis Fagá Celli, e também aos (agora um pouquinho mais distantes) Adriano Benacci e Daniel Mana, pela amizade e companhia nos momentos mais especiais.

Agradeço à grande amiga Letícia Carla Gomes pela cumplicidade e carinho.

Agradeço aos amigos da Graduação, que trilharam comigo o início dessa caminhada, mas agradeço em especial, aos companheiros Giseli Swertz Rocha, Kelly Cristina Rodrigues, Laís Moreira Granato, Diogo Borges Provete, Mário Antonio Sacramento e Mateus de Souza Tercetti, que fizeram (e ainda fazem) parte de uma das melhores etapas da minha vida....

Agradeço aos meus amigos da Pós-Graduação: Cláudia Solano Rocha, Júlio César Miné e Daniela Luz Ambrósio, pelas risadas, pelas incansáveis idas ao McDonald's, pelo auxílio intelectual e pela especial companhia nas horas vagas....

Agradeço pela minha formação:

Agradeço aos meus professores do Ensino Fundamental pela paciência e perseverança no ensino do básico, para que eu pudesse alçar vôos maiores.

Agradeço aos meus professores do Ensino Médio e do Cursinho Pré-vestibular, que me fizeram reconhecer o verdadeiro valor dos estudos.

Agradeço a meus professores da Graduação: em especial à Profa. Dra. Tereza Cristina Orlando e à Profa. Dra. Fátima Sarkis, que me orientaram em estágios curriculares; ao Prof. Dr. Marcelo Pólo por me apresentar a prova final e por sua infindável alegria; à Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa por transmitir o encanto da biologia celular com muito entusiasmo.

Agradeço profundamente ao Prof. Dr. Geraldo Silva pela co-orientação, e ao Prof. Dr. Paulo Márcio de Faria e Silva pela orientação do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço pela Pós-Graduação:

Agradeço ao meu professor e orientador na Pós-Graduação Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pelas aulas ministradas e conhecimento transmitido. Agradeço-lhe também pela oportunidade de me guiar na realização do estágio de docência, para que eu tivesse um contato maior com a arte de lecionar.

Agradeço aos meus professores de Pós-Graduação, Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, Profa. Dra. Maria Teresa Pepato, Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha e Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior pelo conhecimento transmitido.

Agradeço às “meninas da Pós”, Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornelas, da Seção de Pós-Graduação pela amizade e grande ajuda nos trâmites necessários.

Agradeço aos companheiros de laboratório:

Agradeço aos mestrandos Aline Rimoldi Ribeiro e Julio César Renti Ferreira Júnior, e também aos doutorandos Cláudia Solano Rocha, Renata Tomé Alves e Vagner José Mendonça, e ao já Doutor, Júlio César Miné, por compartilharem mais uma etapa e pela companhia diária.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica, Elton Shinti Kawasima (o Buda), Karina Pereira Barbieri e Leandro Augusto Rosseto, pela companhia eventual, mas que não me deixam esquecer o entusiasmo de quando comecei a “fazer ciência”.

Agradeço a técnica do laboratório, Izabel Martinez (a Bel), pelas técnicas a mim ensinadas, risadas, e também por abrir as portas de sua casa e nos receber para confraternizações

Agradeço a técnica do laboratório Therezinha Aparecida Ricci (a Nina) pela ajuda e elaboração das aulas práticas durante meu estágio de docência.

Agradeço também a Maria Zenaide Tita Fernandes (a Zê), pelo auxílio no início do Mestrado e pela presença, que, mesmo esporádica, sempre nos alegra.

Agradeço a todos que colaboraram com a realização deste trabalho:

Agradeço, em especial, ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, que me orientou para a conclusão dessa Dissertação de Mestrado.

Agradeço à Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Vetores da FCF, UNESP-Araraquara, onde, grande parte desse trabalho foi desenvolvida.

Agradeço ao Dr. Marco Túlio Alves da Silva e à Dra. Daniela Luz Ambrósio, pela acessibilidade e por me mostrarem que Biologia Molecular não é um “bicho de sete cabeças”.

Agradeço à Dra. Daniela Luz Ambrósio e às doutorandas Joyce Aparecida Martins e Greiciane Gaburro Paneto do Laboratório de Paternidade pela grandiosa ajuda durante as etapas de sequenciamento.

Agradeço à Cláudia Solano Rocha pelo auxílio técnico e pela análise dos dados.

Agradeço ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior e ao pós-graduando Joaquim Martins, do Centro de Estudos de Insetos Sociais, do Instituto de Biologia da UNESP de Rio Claro, por transmitir conhecimentos teóricos e práticos, e também pelos valiosos esclarecimentos acerca das análises filogenéticas realizadas.

Agradeço *in memoriam* ao Prof. Dr. Oswaldo Paulo Forattini, que, em 1967, instituiu o insetário de Triatominae na Faculdade de Saúde Pública (USP) em São Paulo.

Agradeço ao Prof. Dr. José Maria Soares Barata que ampliou o número de espécies e de colônias de triatomíneos, assim como foi o responsável e manteve o insetário, quando o mesmo foi transferido para o Serviço Especial de Saúde de Araraquara em 1983.

Agradeço aos técnicos do antigo Insetário de Triatominae do SESA-USP, João Luis Molina Gil (o Gil), João Maurício Nóbrega da Silva Filho e Bento Gregório de Jesús, que fizeram a manutenção das colônias no período de 1983 a 2008 e por toda informação acerca estes insetos e experiência que nos foi transmitida.

Agradeço ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, seus pós-graduandos e estagiários, cujos projetos envolvem os triatomíneos e que estão mantendo e ampliando o número de espécies e colônias de Triatominae quando de sua transferência para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, assim como dão suporte a outros grupos de pesquisa dentro e fora do Estado de São Paulo.

Agradeço aos técnicos do biotério Celso Luiz Borsato e Osvaldo Augusto da Silva por auxiliarem nos cuidados com os patos no Insetário.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Macari, então reitor da UNESP, que autorizou a construção do insetário de Triatominae no Campus de Araraquara, em 2008.

Agradeço a Dayse da Silva Rocha, José Jurberg, José Maria Soares Barata, Paulo Silva de Almeida e Sebastião Aldo da Silva Valente, pela doação de exemplares das espécies avaliadas nesse trabalho, utilizados para constituir colônias.

Agradeço à secretária do Departamento de Ciências Biológicas, Margarete Rossi Ferreira, pelo auxílio burocrático e pelas gargalhadas mais gostosas que já ouvi.

Agradeço ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, à Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, ao Dr. Marco Túlio Alves da Silva, à Profa. Dra. Mara Cristina Pinto e à Profa. Dra Eunice Aparecida Bianchi Galati, por aceitarem compor a banca de Qualificação desse trabalho e pela prévia análise do mesmo.

Agradeço ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, à Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, à Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, à Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, ao Dr. Cleber Galvão Ferreira, ao Dr. Marco Túlio Alves da Silva, à Dra. Daniela Luz Ambrósio e à Profa. Dra. Maria Regina Barretto Cicarelli, por aceitarem o convite para indicação a compor a banca de Defesa dessa Dissertação de Mestrado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudos concedida.

A todos, meus sinceros agradecimentos...

DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!

Mário Quintana

“Triste não é mudar de idéia.
Triste é não ter idéias para mudar!”

Apparício Fernando de Brinkerhoff Torelly
“Barão de Itararé”
1895-1971

Sumário

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas e siglas	
Resumo	
Abstract	
Introdução	21
1 - Doença de Chagas	21
2 – Vetores da doença de Chagas: Triatomíneos	28
2.1 – Sistemática e identificação morfológica e molecular dos triatomíneos	30
2.2 - O gênero <i>Triatoma</i>	32
2.2.1 – Espécies avaliadas no estudo: aspectos taxonômicos, morfológicos, moleculares e ecológicos	34
2.2.1.1 - <i>Triatoma baratai</i> Carcavallo e Jurberg, 2000	34
2.2.1.2 - <i>Triatoma costalimai</i> Verano e Galvão, 1958	34
2.2.1.3 – <i>Triatoma guazu</i> Lent e Wygodzinsky, 1979	35
2.2.1.4 - <i>Triatoma matogrossensis</i> Leite e Barbosa, 1953	35
2.2.1.5 - <i>Triatoma sordida</i> (Stal, 1859)	36
2.2.1.6 - <i>Triatoma vanda</i> Carcavallo et al., 2002	37
2.2.1.7 - <i>Triatoma williamsi</i> Galvão et al., 1965	37
2.3 – Justificativas	38
3 – Objetivos	40
3.1 – Objetivos Gerais	40
3.2 – Objetivos Específicos	40
4 - Material e Métodos	41
4.1 – Fluxograma de estudo	41
4.2 – Exemplares	41
4.3 - Extração do DNA genômico	43
4.4 – Iniciadores	45
4.5 - Amplificação dos fragmentos por PCR	45
4.6 – Purificação do DNA amplificado	46
4.7 – Sequenciamento	46
4.8 - Análise filogenética	46
4.9 – Blast	48
4.10 – Mapa dos sítios variáveis	48
4.11 – Sequências utilizadas, disponíveis em banco de dados	48

5 – Resultados	51
5.1 – Extração do DNA genômico	51
5.2 – Isolamento (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse	51
5.3 – Sequenciamento	51
5.4 – O fragmento 16S	52
5.4.1 – Alinhamento	52
5.4.1.1 – Alinhamento inicial (AI)	53
5.4.1.2 – Alinhamento por espécie (AE)	53
5.4.1.3 – BLAST	53
5.4.1.4 – Alinhamento geral (AG)	56
5.4.2 - Análises Filogenéticas	58
5.4.2.1 – Análise de Distância – Neighbor-Joining	58
5.4.2.2 - Máxima Parcimônia	59
5.5 – O fragmento Cytb	60
5.5.1 – Alinhamento	60
5.5.1.1 – Alinhamento inicial (AI)	60
5.5.1.2 – Alinhamento por espécie (AE)	61
5.5.1.3 – BLAST	61
5.5.1.4 – Alinhamento geral (AG)	63
5.5.2 - Análise Filogenética	64
5.5.2.1 – Análise de Distância – Neighbor-Joining	65
5.5.2.2 - Máxima Parcimônia	66
6 – Discussão	69
6.1 – Fragmentos utilizados e análise das sequências	69
6.2 – Metodologias de análises filogenéticas	70
6.3 – Distribuição geográfica das espécies	75
7 – Conclusões	77
Referências	78
Anexo	

Lista de figuras	Pág.
<p>Figura 01: Ciclo da transmissão e da interação parasita-hospedeiros do protozoário <i>T. cruzi</i>. Os números de 1-6 indicam as etapas do ciclo de transmissão: 1- repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 - ato de coçar, o que leva as formas tripomastigotas meta-cíclicas das fezes à lesão deixada pela picada do vetor; 3-4 – invasão celular e multiplicação das formas amastigotas do <i>T. cruzi</i>; 5- rompimento celular e liberação das formas tripomastigotas sanguíneas; 6- ingestão destas pelo triatomíneo. Esta figura foi adaptada da Organização Mundial da Saúde (OMS - <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>) e está disponível em: <http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/GeneroTrypanosoma.htm>. Acesso em: 10/11/2009.</p>	23
<p>Figura 02: Fluxograma de estudo, no qual se observa a sequência das etapas desenvolvidas.</p>	41
<p>Figura 03: Exemplares das espécies estudadas. Todas as espécies estão evidenciadas por exemplares fêmeas, exceto <i>T. costalimai</i>, que é um macho. Fotos de Sueli Gardim.</p>	42
<p>Figura 04: Fluxograma esquemático das três etapas de alinhamento das triplicatas. Alinhamento Inicial (AI), Alinhamento por espécie (AE) e Alinhamento Geral (AG).</p>	47
<p>Figura 05: Eletroforese em gel de agarose 1%, corada com brometo de etídio, da extração do DNAg das espécies avaliadas: <i>T. sordida</i> (<i>T.s.</i>), <i>T. williami</i> (<i>T.w.</i>), <i>T. costalimai</i> (<i>T.c.</i>), <i>T. vanda</i> (<i>T.v.</i>), <i>T. guazu</i> (<i>T.g.</i>), <i>T. baratai</i>, (<i>T.b.</i>) e <i>T. matogrossensis</i> (<i>T.m.</i>).</p>	51
<p>Figura 06: Produto de PCR de isolamento dos fragmentos dos genes 16S (~400pb) e Cytb (~450pb), em triplicata (A, B e C) para as espécies: <i>T. sordida</i> (<i>T.s.</i>), <i>T. williami</i> (<i>T.w.</i>), <i>T. costalimai</i> (<i>T.c.</i>), <i>T. vanda</i> (<i>T.v.</i>), <i>T. guazu</i> (<i>T.g.</i>), <i>T. baratai</i>, (<i>T.b.</i>) e <i>T. matogrossensis</i> (<i>T.m.</i>). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Leader Plus (Fermentas).</p>	52
<p>Figura 07: Eletroferograma gerado pelo sequenciador, com picos bem definidos e que representam o padrão de qualidade das sequências do fragmento 16S.</p>	52
<p>Figura 08: Alinhamento dos 313pb da triplicata das sequências (AI) do fragmento 16S mtDNA. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie, o número da colônia estudada e o número da triplicata: <i>T. baratai</i>, (<i>Tb</i>), <i>T. costalimai</i> (<i>Tc</i>), <i>T. guazu</i> (<i>Tg</i>), <i>T. matogrossensis</i> (<i>Tm</i>), <i>T. sordida</i> (<i>Ts</i>), <i>T. vanda</i> (<i>Tv</i>) e <i>T. williami</i> (<i>Tw</i>). A primeira sequência apresentada é a sequência consenso (consensus), gerada a partir de todas as outras sequências avaliadas, com a finalidade de indicar com mais clareza os sítios polimórficos.</p>	54

<p>Figura 09: Alinhamento conduzido pelo programa Clustal W das sequências do fragmento 16S mtDNA (329pb) e de sequências disponíveis no GenBank®, com seus respectivos números de acesso. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie, seguida do número da colônia estudada, ou do número de acesso da sequência: <i>T. baratai</i> (Tb), <i>T. brasiliensis</i> (T bras), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. garciabesi</i> (T gar), <i>T. guasayana</i> (T. guas), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. jurbergi</i> (Tj), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sherlocki</i> (T sher), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vandae</i> (Tv), <i>T. williami</i> (Tw) e <i>Rhodnius neglectus</i> (Rn).</p>	57
<p>Figura 10: Dendogramas filogenéticos baseados nas sequências da região 16S do mtDNA utilizando a análise NJ, (A) com o modelo “Kimura de dois parâmetros” (Kimura-2) e (B) com o modelo da “Maximum Composite Likelihood” (MCL). Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada, ou após o nome da espécie está o número de acesso no GenBank®: <i>T. baratai</i>, (Tb), <i>T. brasiliensis</i> (T bras), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. garciabesi</i> (T gar), <i>T. guasayana</i> (T. guas), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. jurbergi</i> (Tj), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sherlocki</i> (T sher), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vandae</i> (Tv), <i>T. williami</i> (Tw) e <i>Rhodnius neglectus</i> (Rn). Notam-se duas subdivisões dentre as espécies do Centro-Oeste (chaves vermelha e alaranjada). A chave verde indica as espécies encontradas na região Nordeste do país.</p>	59
<p>Figura 11: Dendograma filogenético (MP) baseado na região 16S. Na figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada, ou o número de acesso no GenBank®: <i>T. baratai</i>, (Tb), <i>T. brasiliensis</i> (T bras), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. garciabesi</i> (T gar), <i>T. guasayana</i> (T. guas), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. jurbergi</i> (Tj), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sherlocki</i> (T sher), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vandae</i> (Tv), <i>T. williami</i> (Tw) e <i>Rhodnius neglectus</i> (Rn). As espécies da região Centro-Oeste (azul), apresentam duas subdivisões (chaves vermelha e alaranjada). Espécies da região Nordeste (verde).</p>	60
<p>Figura 12: Alinhamento (AI) das sequências do fragmento Cytb (401pb), obtido em análise pelo programa Clustal W. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie, o número da colônia estudada e o número da triplicata: <i>T. baratai</i>, (Tb), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vandae</i> (Tv), e <i>T. williami</i> (Tw).</p>	62
<p>Figura 13: Alinhamento (AG) de 316pb das sequências do fragmento Cytb e de sequências disponíveis no GenBank®, conduzido pelo programa Clustal W. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o seu respectivo número de acesso ou o número da colônia estudada: <i>T. baratai</i>, (Tb), <i>T. brasiliensis</i> (T brasil), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. infestans</i> (T infest), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sherlocki</i> (T sherlo), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vandae</i> (Tv), <i>T. williami</i> (Tw), <i>Panstrongylus megistus</i> (P megist) e <i>Rhodnius neglectus</i> (Rn).</p>	63

<p>Figura 14: Dendogramas filogenéticos baseados nas sequências da região Cytb do mtDNA utilizando a análise NJ, com o modelo Kimura-2 (A) e com o modelo da MCL (B). O comprimento dos ramos representa a distância genética entre os indivíduos. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada, ou após o nome da espécie está o número de acesso no GenBank®: <i>T. baratai</i> (Tb), <i>T. brasiliensis</i> (T brasil), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. infestans</i> (T infest), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sherlocki</i> (T sherlo), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vanda</i> (Tv), <i>T. williami</i> (Tw), <i>P. megistus</i> (P. megist) e <i>Rhodnius neglectus</i> (Rn).</p>	65
<p>Figura 15: Dendograma filogenético da região Cytb do mtDNA baseado na análise de MP. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada ou o número de acesso da sequência: <i>T. baratai</i>, (Tb), <i>T. brasiliensis</i> (T brasil), <i>T. costalimai</i> (Tc), <i>T. guazu</i> (Tg), <i>T. matogrossensis</i> (Tm), <i>T. sherlocki</i> (T sherlo), <i>T. sordida</i> (Ts), <i>T. vanda</i> (Tv), <i>T. williami</i> (Tw), <i>P. megistus</i> (P megist) e <i>Rhodnius neglectus</i> (Rn).</p>	66
<p>Figura 16: Figura 16: Gráficos gerados pelo programa DAMBE. O gráfico da esquerda representa o alinhamento relativo ao fragmento 16S, e o da direita, ao Cytb. A linha azul corresponde a transições (s) e a verde a tansversões (v).</p>	67
<p>Figura 17: Mapas da região Centro-Oeste do Brasil, com pontuações coloridas, que indicam a distribuição (locais de notificação) das espécies pertencentes ao subcomplexo <i>matogrossensis</i> que foram abordadas nesse estudo. Já os círculos apontam os agrupamentos das espécies com base nas relações filogenéticas obtidas respectivamente ao fragmento 16S (A) e Cytb (B).</p>	68
<p>Figura 18: Mapa da América do Sul, com destaque para região de endemismo e dispersão da domiciliação da espécie <i>T. sordida</i> a partir da região Centro-Oeste do Brasil. As linhas escuras marcam os limites de domiciliação dos triatomíneos (Forattini, 1980).</p>	68

Lista de tabelas	Pag.
Tabela 01: Origem e início das colônias estudadas.	43
Tabela 02: Sequências disponíveis no GenBank® , que foram utilizadas nas análises filogenéticas referentes aos fragmentos 16S (A) e Cytb (B).	49
Tabela 03: Mapa dos sítios variáveis gerado pelo programa NetWork 4.5, a partir do alinhamento (AG) do fragmento 16S. As primeiras três linhas indicam a posição dos sítios polimórficos e as outras, os sítios variáveis para cada uma das espécies estudadas.	58
Tabela 04: Mapa dos sítios variáveis gerado pelo programa NetWork 4.5, a partir do alinhamento (AG) do fragmento Cytb. As primeiras três linhas indicam a posição dos sítios polimórficos e as outras, os sítios variáveis para cada uma das espécies estudadas.	64

Lista de abreviaturas e siglas

% - porcentagem

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

A – nucleotídeo adenina

AE alinhamento por espécie

AG e alinhamento geral

AI alinhamento

BA / MA / MG / PR / PB / PI / RS / SC / SP / MS / GO / MT / RJ - Estados brasileiros (Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Mato Grosso e Rio de Janeiro)

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

C – nucleotídeo citocina

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COI - citocromo oxidase I do mtDNA

CTA - Colônia de Triatomíneos de Araraquara

Cytb - citocromo b do mtDNA

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNAg - DNA genômico

DNTP - desorribonucleotídeo trifosfatado

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ensaios iminoenzimáticos

F – sequencia Forward, da porção 5' para 3'

FCF-UNESP/Araraquara - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista - Campus de Araraquara.

g – força da gravidade

G – nucleotídeo guanina

GenBank® – banco de dados público de sequencias de nucleotídeos

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

Kimura 2 - Kimura de dois parâmetros

LNIRTT – IOC - Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz

M - molar

MCL - Maximum Composite Likelihood

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL - mililitro

mm – milímetros

mM - milimolar

MP - máxima parcimônia

MS – Ministério da Saúde

mtDNA - DNA mitocondrial

NaCl – Cloreto de Sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

nDNA – DNA nuclear

NJ - Neighbor-Joining-

°C – graus Celsius

OMS / WHO - Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

Pb - pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

PM – Peso Molecular

R – sequencia Reverse da porção 3' para 5'.

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorfism – fragmentos polimórficos gerados por restrição

s - transições (s)

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear

SNC - Serviço Nacional de Chagas de Córdoba na Argentina

T – nucleotídeo timina

TE / TAE – solução tampão

Tris-HCl – Tris-Ácido clorídrico

v - transversões (v).

V – volts

µg/ml – micrograma por mililitro

µl - microlitro

Resumo

Relação filogenética entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais.

A doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, cujos vetores pertencem à subfamília Triatominae. Os triatomíneos distribuem-se distribuídos por toda região Neotropical e epidemiologicamente se destacam as espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. O gênero *Triatoma* é o mais numeroso e foi subdividido em complexos específicos de acordo com semelhanças morfológicas e distribuição geográfica de suas espécies. As sete espécies estudadas podem ser encontradas na região Centro-Oeste do Brasil, das quais seis pertencem ao subcomplexo *matogrossensis* (*T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. vanda* e *T. williami*). A outra espécie, *T. sordida* pertence ao subcomplexo *sordida*. O objetivo deste estudo foi determinar a posição filogenética das sete espécies ocorrentes na região Centro-Oeste, por meio de comparação das sequências dos fragmentos citocromo b e 16S do DNA mitocondrial, visto que até o momento não foi determinada a posição de *T. baratai* e *T. vanda* com base em dados moleculares. Os exemplares avaliados são oriundos de colônias mantidas junto ao Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP - Araraquara. Após a extração do DNA genômico e da amplificação dos fragmentos 16S e Cytb, procedeu-se o sequenciamento do DNA em seqüenciador automático, modelo ABI 377. As sequências obtidas juntamente com outras sequências (do mesmo fragmento) já disponíveis no GenBank, foram alinhadas com auxílio do programa Clustal W do BioEdit e as inferências filogenéticas foram conduzidas utilizando-se análises de parcimônia e de distância com o programa MEGA 3.1. De acordo com os resultados encontrados, *T. costalimai* mostrou-se mais distante das demais espécies e foi posicionada como grupo externo. As outras espécies distribuíram-se em dois grupos: o primeiro composto pelas espécies *T. vanda* próxima a *T. matogrossensis* e, externo a essas, *T. sordida*; o segundo grupo compreende *T. guazu* fortemente relacionado com *T. williami* e próximos a *T. baratai*. Além da presença de dois grupos bem definidos, podemos notar a presença de *T. sordida* em meio às espécies do subcomplexo *matogrossensis*. Conclui-se que a análise filogenética, por meio do gene 16S, posiciona *T. baratai* e *T. vanda* junto ao subcomplexo *matogrossensis*, porém em dois grupos distintos.

Auxílio Financeiro: CNPq

Palavras-Chave: Triatominae, Filogenia, Sequenciamento, 16S, Citocromo b

Abstract

Phylogenetic relationship of seven Triatominae species (Hemiptera, Reduviidae) from Central West Region of Brazil based on mitochondrial genes sequences

The protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, is transmitted by vectors that belong to the subfamily Triatominae. The triatomines are distributed throughout the Neotropical region and species from *Panstrongylus*, *Rhodnius* and *Triatoma* genus stand out epidemiologically. The *Triatoma* genus is the largest and was divided in specific complexes according to morphological similarities and geographical distribution of its species. The seven species studied can be found in the Central West Region of Brazil, of which six belong to the *matogrossensis* subcomplex (*T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vanda*e and *T. williami*). The other specie, *T. sordida* belong *sordida* subcomplex. The aim of this study was to determine the phylogenetic position of the seven species from Central West Region by comparing the 16S and Cytb fragments sequences of the mitochondrial DNA, since so far not been given the position of *T. baratai* and *T. vanda*e based DNA sequences. The specimens evaluated came from colonies maintained at the Insectarium of Triatominae, Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP - Araraquara. After extraction of genomic DNA and amplification of the 16S and Cytb fragments, it was sequenced in an automatic DNA sequencer, model ABI 377. The sequences obtained and other sequences (of the same fragment) already available in GenBank were aligned using the Clustal W program of BioEdit and the phylogenetic inferences were conducted using the analysis of parsimony and distance with the MEGA 3.1 program. According to the results, *T. costalimai* was more distant from other species and was placed as an outside group. Other species are distributed in two groups, the first comprising the species *T. vanda*e very close to *T. matogrossensis* and external of these, *T. sordida*. The second group includes *T. guazu* strongly related to *T. williami* and close to *T. baratai*. Besides the presence of two well defined groups, our analyses have shown that *T. sordida* was included among the species of *matogrossensis* subcomplex. We conclude that phylogenetic analysis using the 16S gene sequence show the inclusion of the *T. baratai* and *T. vanda*e species in the *matogrossensis* subcomplex, however into two separated groups.

Financial Support: CNPq.

Keywords: Triatominae, phylogeny, Sequencing, 16S, Cytochrome b.

INTRODUÇÃO

A descrição da tripanossomíase americana em 1909, por Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, foi um marco na medicina tropical. Chagas descreveu a doença no município de Lassance no Estado de Minas Gerais. Dessa forma, esse mal passou a ser conhecido também como doença de Chagas, nome apresentado em uma conferência da Academia Nacional de Medicina, em 1923, por Miguel de Oliveira Couto, então presidente da Academia (O caso, 1923).

Todo o ciclo da doença foi apontado pelo próprio Chagas: o agente etiológico, um protozoário flagelado, que recebeu o nome de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz; o inseto vetor, hematófago da ordem Hemiptera pertencente ao gênero “*Conorhinus*”, atualmente é conhecido como *Panstrongylus megistus*; os reservatórios de *T. cruzi*, mamíferos presentes tanto no ambiente peridoméstico como no silvestre (Chagas, 1909).

Este estudo visa ampliar os conhecimentos das relações filogenéticas dos triatomíneos que apresentam como centro de dispersão e endemismo a região Centro-Oeste do Brasil.

As sete espécies avaliadas neste estudo pertencem ao gênero *Triatoma*, que por apresentar grande número de espécies, foi subdividido em complexos específicos de acordo com semelhanças morfológicas e distribuição geográfica de suas espécies. Das sete espécies estudadas, seis pertencem ao subcomplexo *matogrossensis*: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. vandae* e *T. williami*; e uma espécie, *T. sordida*, pertence ao subcomplexo *sordida*.

As relações filogenéticas foram traçadas com base no sequenciamento de dois fragmentos mitocondriais, o citocromo b e o 16S. Foram utilizadas duas metodologias de análise, a de parcimônia, com o algoritmo *Maximum Parsimony*, e a de distância genética, utilizando-se os algoritmos *Neighbor-Joining* e *Maximum Composite Likelihood*. Esses algoritmos estão disponíveis junto ao programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Mega).

1 - Doença de Chagas

O agente etiológico da tripanossomíase americana ou doença de Chagas é um protozoário eucarioto, pertencente à Ordem Kinetoplastida, denominado *Trypanosoma cruzi*, que se apresenta sob três formas principais: tripomastigota, forma flagelada com membrana

ondulante, não apresentam capacidade reprodutiva, seu cinetoplasto localiza-se na porção posterior do parasito (oposta ao flagelo livre) e o núcleo é geralmente central e; epimastigota, forma flagelada, com capacidade reprodutiva (por divisão binária) no trato digestório do vetor (triatomíneos) e que apresenta o cinetoplasto localizado próximo ao núcleo, na região central do parasito; e amastigota, forma arredondada, sem flagelo livre, com capacidade de multiplicação intracelular (Argolo et al., 2008; Noireau et al., 2009).

A forma infectante de *T. cruzi* é a tripomastigota metacíclica, que pode ser encontrada na ampola retal insetos dos vetores e são eliminadas em suas fezes. Durante o repasto sanguíneo o triatomíneo suga o sangue, o que gera uma compressão abdominal no inseto, e o leva a defecar próximo ao local da picada (Fig. 01 - etapa 1). O indivíduo, ao coçar-se, em resposta à reação alérgica causada pela saliva do inseto, pode levar as fezes infectadas à lesão deixada pela picada ou às mucosas (geralmente a bucal ou a ocular) e conjuntivas próximas, por onde o parasita penetra (Fig. 01 - etapa 2). O protozoário não transpõe a pele íntegra, no entanto qualquer tipo de escoriação pode servir como porta de entrada (Forattini, 1980; Deane, 1984; Argolo et al., 2008).

Após a penetração no hospedeiro vertebrado, o parasito invade as células do sistema fagocítico mononuclear, se reorganiza e assume a forma amastigota intracelular, que se multiplica por divisão binária (Fig. 01 - etapas 3 e 4). Com o aumento do número de parasitos, a célula se rompe e libera as formas tripomastigotas nos espaços intersticiais, que infectam células vizinhas e se disseminam pelo organismo por meio dos sistemas linfático e sanguíneo (Fig. 01 - etapa 5). As principais células atingidas são as do miocárdio e dos tecidos musculares lisos. A destruição desses tecidos gera problemas principalmente no coração, esôfago e cólon intestinal. Os danos ao coração podem levar a insuficiência cardíaca, arritmias e óbito, em casos mais graves (Argolo et al., 2008).

Durante o repasto sanguíneo, os triatomíneos podem ingerir as formas tripomastigotas circulantes (Fig. 01 - etapa 6), que ao atingirem o intestino posterior desses insetos, assumem a forma epimastigota. Nessa etapa o parasito volta a se reproduzir assexuadamente, o que gera uma infecção permanente do vetor. Esses flagelados migram para a ampola retal do inseto, onde retomam a forma tripomastigota metacíclica, que será expelida com suas fezes (Argolo et al., 2008; Noireau et al., 2009) (Fig. 01 – etapa 1).

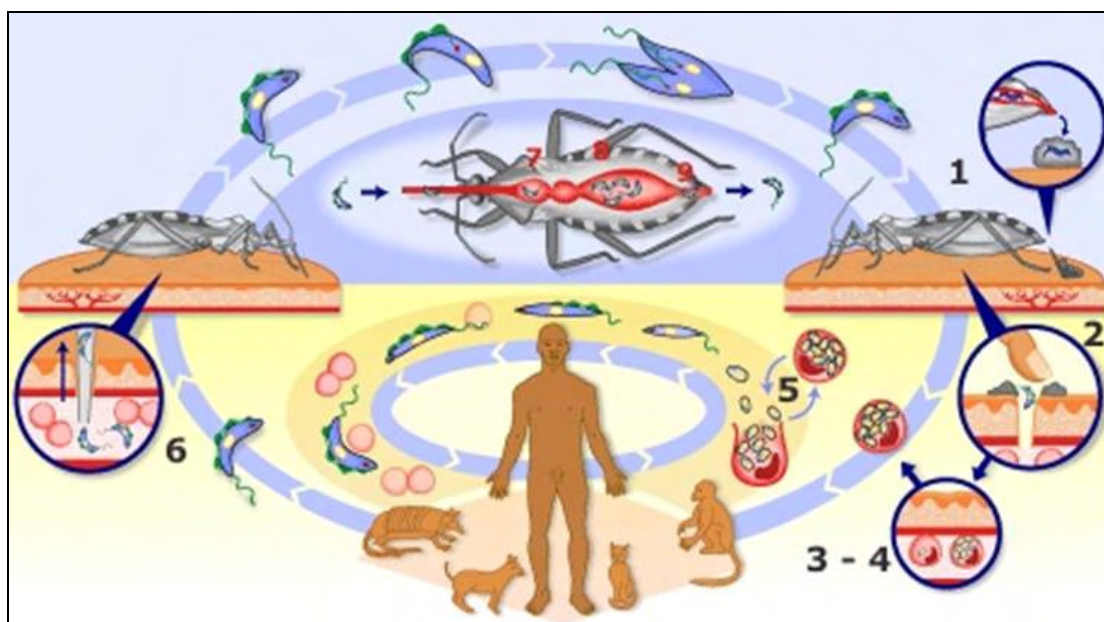


Figura 01: Ciclo da transmissão e da interação parasita-hospedeiro do protozoário *T. cruzi*. Os números de 1-6 indicam as etapas do ciclo de transmissão: 1- repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 - ato de coçar, o que leva as formas tripomastigotas metacíclicas das fezes à lesão deixada pela picada do vetor; 3-4 – invasão celular e multiplicação das formas amastigotas do *T. cruzi*; 5- rompimento celular e liberação das formas tripomastigotas sanguíneas; 6- ingestão destas pelo triatomíneo. Esta figura foi adaptada da Organização Mundial da Saúde (OMS - <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>) e está disponível em: <http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/GeneroTrypanosoma.htm>. Acesso em: 10/11/2009.

A gravidade da infecção relaciona-se a linhagem de *T. cruzi*, à idade do indivíduo e ao número de protozoários que deram início à infecção. A forma tripomastigota de *T. cruzi* apresenta basicamente dois tipos polimórficos, a forma larga e a fina, e entre essas podem ocorrer formas intermediárias. Essas formas variam quanto à capacidade infectante, sendo a forma fina geralmente mais virulenta. Além disso, as diferentes linhagens apresentam preferências a distintos tipos celulares. Algumas linhagens são miotrópicas e são pouco encontradas nas células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM); enquanto outras são reticulotrópicas, e se encontram preferencialmente no interior de macrófagos do baço e do fígado (Andrade, 1974, 1985; Andrade e Magalhães, 1997; Martins et al., 2003).

Com o auxílio de técnicas moleculares foi proposta a caracterização de duas linhagens de *T. cruzi*, a TCI, que inclui cepas predominantes no ambiente silvestre, e a TCII, que agrupa cepas ocorrentes no ambiente doméstico. A linhagem TCII é dividida em cinco

sublinhagens, IIa, IIb, IIc, IId e IIe (Souto et al., 1996; Brisse et al., 2000, 2001; Stolf et al., 2003). Atualmente Marcili et al. (2009) e Lewis et al. (2009) classificam as diferentes cepas de *T. cruzi* em seis linhagens: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI.

A doença de Chagas apresenta evolução lenta e progressiva, com duas fases distintas: uma fase aguda e uma fase crônica. Durante a fase aguda os principais sintomas são edema bipalpebral e unilateral (sinal de Romaña), chagoma de inoculação (nódulo inflamatório subcutâneo) e pode apresentar febre e/ou aumento do fígado e do baço (Dias, 1997; Argolo et al., 2008).

Essa fase caracteriza-se por uma alta parasitemia (observação de um grande número de parasitos circulante), que se inicia entre o oitavo e o décimo segundo dia após a penetração do parasito, isso varia de acordo com a linhagem e via de penetração do parasito. Essa é uma fase de intensa multiplicação intracelular do *T. cruzi*, que aumenta exponencialmente o número de formas circulantes, até atingir o que chamamos de pico parasitêmico, momento no qual o parasito se dissemina por todo organismo e atinge vários órgãos (MS, 2004; Steindel et al., 2008).

Em alguns casos mais graves, com o grande número de células parasitadas que se rompem e com os intensos processos inflamatórios gerados, pode ocorrer taquicardia, arritmias e insuficiência cardíaca, que levam o indivíduo a óbito ainda na fase aguda da doença. Como exemplo desse processo, em 2005, foram relatados às autoridades de saúde do Estado de Santa Catarina vinte e quatro casos (sendo três fatais) de febre hemorrágica, todos associados à ingestão de caldo de cana (MS, 2008a). Estudos posteriores constataram a contaminação do caldo por *T. cruzi* e que caracterizam a forma aguda da doença de Chagas, assim como as reações observadas (Steindel et al., 2008). Na região Norte do Brasil, entre 2005 e 2007, foram registrados surtos de transmissão de *T. cruzi* pelo consumo do suco de açaí, constando mais de cem ocorrências e oito óbitos (MS, 2008b).

No entanto, quando o sistema imunológico do organismo começa a responder à infecção, em torno de 4 a 5 semanas após a penetração do *T. cruzi*, a parasitemia, que se encontrava em uma fase exponencial de crescimento, decresce rapidamente. Nessa fase, o parasito desenvolve-se assintomaticamente, o que indica uma fase de latência do parasito, conhecida como forma indeterminada da doença de Chagas (MS, 2004).

Com a evolução da doença para a fase crônica, notam-se as formas clínicas mais frequentes, dentre elas as cardiopatias chagásicas e a formação dos “megas” (megaesôfago e

megacólon). Essas manifestações geralmente ocorrem pela destruição das fibras musculares cardíacas, e das fibras lisas e células nervosas ganglionares do sistema digestório. Outras alterações podem ser observadas nessa fase da doença, principalmente no sistema nervoso central, fígado, baço, linfonodos (Argolo et al., 2008; Kenneth et al., 1965).

O diagnóstico laboratorial da tripanossomíase americana difere de acordo com a fase da doença, aguda ou crônica da doença. Como a fase aguda é caracterizada por alta parasitemia no sangue periférico, o diagnóstico pode ser feito por meio de exames parasitológicos (exame de sangue e hemocultura) e sorológicos (principalmente por hemaglutinação, imuno-fluorescência e ensaios imunoenzimáticos - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA). Já na fase crônica da doença, os exames laboratoriais mais utilizados são o xenodiagnóstico, biópsia dos tecidos lesados, ELISA, hemocultura, inoculação em cobaias e testes sorológicos, pois há grande dificuldade em observar parasitos no sangue circulante (Gomes, 1998; Ribeiro e Rocha, 1998).

Com relação ao tratamento, apenas dois fármacos mostraram-se ativos contra o *T. cruzi*: o benzonidazol e o nifurtimox. Ambos os medicamentos são indicados apenas durante a fase aguda da doença e apresentam vários efeitos colaterais. Esses medicamentos não são indicados para pacientes que se encontram na fase crônica da doença de Chagas, fase mais extensa e na qual se encontra a maioria das pessoas infectadas com *T. cruzi*. Nessa fase, apenas são tratados os sintomas de cardiopatias e as alterações no sistema digestório, com o uso de antiarrítmicos, implantação de marcapassos e intervenções cirúrgicas (Coura e Cançado, 2009).

A doença de Chagas é prevalente na América Latina e acomete aproximadamente 15 milhões de indivíduos, dos quais 1,6 milhões desses casos são brasileiros e encontram-se na fase crônica da doença (WHO, 2007; MS, 2009). O contágio por *T. cruzi* pode se dar de várias formas, entre as quais se destacam a transmissão vetorial e por meio de transfusões sanguíneas. Outras formas de transmissão também são possíveis, como a transmissão congênita pela via transplacentária, em acidentes laboratoriais (Herwaldt, 2001; Chieffi e Amato Neto, 2000), em transplantes de órgãos de pacientes infectados e a forma oral, que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente caldo de cana e de açaí (Lewinsohn, 2005; WHO, 2007). A via oral da transmissão da doença de Chagas requer atualmente especial atenção, pois se caracteriza como um problema de saúde pública, com surtos localizados (MS, 2008a; MS, 2008b).

Entretanto, as emigrações de latino-americanos possibilitam a transmissão, principalmente por transfusões sanguíneas, para pessoas de outros continentes (Schmunis e Dias, 2000). Assim, um eficiente controle em bancos de sangue diminuiria o risco da transmissão do *T. cruzi* em transfusões sanguíneas. O tratamento e acompanhamento pré e neonatal diminuiriam as chances de transmissão congênita. A educação sanitária e ambiental, o tratamento precoce dos doentes e o combate ao triatomíneo, são medidas que podem trazer excelentes resultados no controle da doença de Chagas (Dias e Schofield, 1998).

A transmissão por meio das fezes de triatomíneos contaminadas com o protozoário é a mais comum e é responsável por cerca de 40.000 novos casos anuais na América Latina (WHO, 2007). A transmissão vetorial é de grande importância epidemiológica, pois se trata de uma zoonose típica de ambientes rurais e periurbanos. As precárias condições de moradia e de saneamento, como irregularidades nas construções camponesas e a falta de higiene, favorecem a formação de colônias de triatomíneos no peridomicílio e no interior das casas (intradomicílio), à procura de abrigo e alimento, fenômeno conhecido como domiciliação (Dias e Schofield, 1998).

Todas as espécies de triatomíneos podem se infectar e transmitir *T. cruzi*, no entanto apenas algumas espécies participam realmente desse ciclo. Assim, podemos observar claramente uma divisão nos ciclos de transmissão do parasito: um ciclo silvestre e um ciclo doméstico (Forattini, 1980; Argolo et al., 2008).

No ciclo silvestre, várias espécies de mamíferos podem servir de hospedeiros para *T. cruzi*. Os roedores, marsupiais, carnívoros, quirópteros e primatas são mais comumente encontrados com a infecção. Os mamíferos contaminam-se provavelmente pela mucosa do sistema digestório, ao caçar e ingerir os vetores infectados, ou ao lambar os pelos impregnados com fezes contaminadas do triatomíneo. Outra forma de infecção pode dar-se pelo fato do animal coçar-se, o que facilitaria a penetração de *T. cruzi* no organismo, pelo local da picada. As outras classes de vertebrados – aves, répteis, anfíbios e peixes - são refratários ao *T. cruzi*, no entanto, esses também servem como fonte alimentar para os triatomíneos (Torres e Dias, 1982; Deane, 1984; Noireau et al., 2009).

Muitas espécies de triatomíneos participam desse ciclo, transmitindo o parasito de um organismo a outro, durante o repasto sanguíneo ou quando se encontram na cadeia alimentar dos mamíferos. É bastante comum encontrar essas espécies de vertebrados e invertebrados, hospedeiras do *T. cruzi*, naturalmente infectadas. Isso demonstra claramente a

circulação desse protozoário no ambiente silvestre, o que dificulta bastante o controle da circulação desse protozoário (Argolo et al., 2008).

É notória a ação antrópica sobre os ambientes naturais, o que gera uma crescente devastação do meio ambiente. Isso ocorre principalmente para exploração de recursos naturais e aumento das áreas habitáveis e de cultivo, o que se reflete em um crescimento descontrolado dos municípios em várias regiões do país, onde se implantam habitações precárias, e há falta de recursos, de educação e de saneamento básico. Dessa forma, o contato do ser humano com o ambiente silvestre é cada vez maior, o que gera diminuição do habitat original de muitos animais, inclusive dos triatomíneos. Todas essas ações favorecem o fenômeno de domiciliação dos insetos vetores, que se refugiam próximos aos domicílios, em busca de abrigo e alimento. Assim, se perpetua a transmissão de várias doenças ao homem (antropozoonoses), e dentre essas, a doença de Chagas (Forattini, 1980; Diotaiuti, 2000; Vinhaes e Dias, 2000; Peñaranda-Carrillo et al., 2002; Tartarotti et al., 2004; Silva et al., 2005b; Oliveira e Silva, 2007).

A expansão da tripanossomíase americana acompanha o processo de colonização e adaptação dos triatomíneos às habitações humanas, fruto da degradação do meio ambiente. Com a domiciliação dos vetores configuram-se os ciclos domésticos e peridomésticos de *T. cruzi*. No ciclo peridoméstico os vetores interagem com os animais que convivem em torno das habitações humanas e alimentam-se desses. Já o ciclo doméstico é caracterizado pela presença dos triatomíneos dentro das residências e utilizam o homem como fonte alimentar, o que aumenta a probabilidade de transmissão do protozoário ao ser humano (Vinhaes e Dias, 2000; Argolo et al., 2008).

Muitos aspectos sócio-culturais e político-econômicos envolvem a transmissão, prevenção e tratamento da doença de Chagas, assim, se faz necessário um maior empenho dos sistemas nacionais de saúde, no sentido de minimizar as desigualdades sociais e prover saneamento e informações adequadas à população rural. Desse modo, a implantação de programas sustentáveis de saúde e de moradia em áreas endêmicas, pode garantir o sucesso do atendimento às pessoas infectadas, bem como contribuir com a prevenção realizada pela vigilância epidemiológica (Dias, 1998, 2007, Argolo et al., 2008).

A comunidade científica, por meio de estudos acerca da doença de Chagas, do agente etiológico e de seus vetores, tem contribuído com a implantação, sustentação e avaliação das políticas de controle vetorial (Dias, 2007).

Vários estudos demonstram o elevado custo do tratamento das pessoas com doença de Chagas em áreas endêmicas, dessa forma, maiores investimentos na sustentação dos programas de prevenção poderiam minimizar os custos no tratamento da doença, gerando melhores retornos econômicos e sociais (Brener, 1986; Schmunis e Dias, 2000; Almeida, 2002; Vieira, 2002).

Várias são as doenças consideradas negligenciadas tanto pelo poder público como pela indústria farmacêutica. Isso se deve à grande parte das pessoas afetadas por essas doenças, estarem geralmente distantes do mercado de trabalho formal e não apresentarem grande representatividade política. Dessa forma, os benefícios do investimento em programas preventivos só serão visíveis em longo prazo, de modo que os programas de prevenção e controle das doenças não sejam priorizados pelos governos. No caso da doença de Chagas, ainda há agravantes como a evolução lenta da doença e sua apresentação geralmente silenciosa, que não se faz notar. No entanto, apesar da falta de recursos em muitas regiões endêmicas, as medidas de controle vetorial vêm sendo bem sucedidas. Porém os agentes de saúde têm enfrentado alguns desafios no que diz respeito à persistente re-colonização dos vetores nas habitações humanas aspergidas com inseticidas (Dias, 1995, 2007; Schmunis e Dias, 2000; Argolo et al., 2008).

Dessa forma, sem um tratamento eficaz da doença de Chagas e como a domiciliação dos vetores ainda persiste em algumas áreas, notamos uma grande dificuldade no controle dessa doença. Assim sendo, o controle vetorial dentro das residências e no peridomicílio, principalmente em áreas endêmicas, mostra-se, atualmente, a medida mais eficaz no combate à infecção pelo *T. cruzi*. Contudo para um controle vetorial adequado torna-se estritamente necessário um maior número de estudos e conhecimento mais amplo acerca dos triatomíneos.

2 – Vetores da doença de Chagas: Triatomíneos

Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos pertencentes à Ordem Hemiptera, Família Reduviidae, sendo que todas as espécies da subfamília Triatominae são potencialmente transmissoras de *T. cruzi*, porém alguns percevejos do gênero *Cimex* (Família Cimicidae) já foram encontrados parasitados por esse protozoário (Chagas, 1909; Lent e Wygodzinsky, 1979; Galvão, 2003).

Durante todo o ciclo de vida, os triatomíneos alimentam-se de sangue. Esses insetos apresentam ciclo de vida em torno de dois anos e passam por vários estádios evolutivos. Assim, a partir do ovo, eclode uma ninfa de primeiro estágio, que evolui até o quinto estágio em um período médio de seis meses. Após os cinco estádios ninfais, esses insetos assumem a forma adulta, se diferenciam em macho e fêmea, morfologicamente distintos, que se reproduzem por meio de relação sexuada (Argolo et al., 2008; Noireau et al., 2009).

No Brasil, esses insetos apresentam domiciliação frequente principalmente em regiões com domínios de caatinga e cerrado. Vários trabalhos comprovaram a presença de triatomíneos também em regiões de Mata Atlântica, o que demonstra a capacidade dispersiva e adaptativa desses insetos e, embora a devastação causada pela ação antrópica favoreça a domiciliação desses vetores, isso ocorre esporadicamente, nesse domínio, o que não significa inexistência da circulação de *T. cruzi* no ambiente silvestre (Forattini, 1980; Sessa et al., 2002; Leite, 2008).

Atualmente nota-se a presença de triatomíneos em várias regiões da bacia amazônica, inclusive no peri e intradomicílio e, com isso, são descritos casos de doença de Chagas autóctones (Galvão et al., 1998; Valente, 1999; Rocha et al., 2004; Pinto et al., 2007; Massaro, et al., 2008). Esses eventos ocorrem por vários motivos: desmatamento descontrolado, habitações humanas e áreas de trabalho que alteram a ecologia dos reservatórios e dos vetores silvestres, o que pode favorecer a adaptação de insetos ao ambiente domiciliar. Esses fatores aproximam os elementos dos ciclos silvestre e doméstico, e pode vir a caracterizar uma área endêmica potencial para a doença de Chagas (Coura et al., 1994; Dias et al., 2002, Argolo et al., 2008).

Os triatomíneos apresentam hábitos noturnos, horário no qual saem de seus esconderijos para se alimentarem. Durante o dia, esses insetos escondem-se frequentemente em frestas, buracos, ou em meio à palha utilizada como telhado ou colchão nas habitações humanas. Alguns destes vetores também apresentam preferência por ambientes mais secos ou áridos, por exemplo, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, e outros por ambientes úmidos, como é o caso de *P. megistus*, no entanto, todos buscam sempre locais quentes e pouco iluminados (Forattini, 1980, Argolo et al., 2008).

2.1 – Sistemática e identificação morfológica e molecular dos triatomíneos

Atualmente são conhecidas 142 espécies de Triatominae, divididas em cinco tribos nas quais estão distribuídos em 15 gêneros (Schofield e Galvão, 2009) ou em 18 gêneros (Hypsa et al., 2002; Ceretti Júnior et al., 2008; Rocha et al., 2009), todavia, *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* são epidemiologicamente os mais importantes.

A identificação específica e a sistemática dos triatomíneos têm se pautado fundamentalmente em observações morfológicas, principalmente por meio de microscopia óptica (Lent e Wygodzinsky, 1979). Nessa temática destacam-se os estudos conduzidos por Jurberg et al., que utilizam como parâmetro morfológico a genitália masculina, metodologia largamente utilizada para a validação de novas espécies (Lent e Jurberg, 1967, 1968, 1969, 1975; Jurberg et al., 1997).

A partir da década de 1960, as análises morfológicas foram auxiliadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que possibilitou uma melhor visualização dos parâmetros morfológicos com imagens mais detalhadas. Essa metodologia também auxiliou no esclarecimento do *status* de algumas espécies de Triatominae (Rosa et al., 1992; 1999).

No entanto, apenas a análise de parâmetros morfológicos nem sempre conseguem esclarecer todas as questões taxonômicas. Como é o caso de alguns complexos de espécies crípticas, como as espécies do subcomplexo *T. brasiliensis* e espécies do gênero *Rhodnius* (Costa et al., 1997; Monteiro et al., 2001; Jurberg, 2003). Nesses casos, a fim resolver essas questões, são necessárias ferramentas mais sensíveis, para a distinção dessas espécies. Assim, a eletroforese de proteínas da hemolinfa foi uma tentativa no sentido de não utilizar apenas caracteres morfológicos para a identificação de espécies de Triatominae (Actis et al., 1964).

Estudos enzimáticos também contribuíram para a identificação dos triatomíneos: Costa et al. (1997) distinguiram quatro populações de *Triatoma brasiliensis* do Nordeste e Sudeste do Brasil, atualmente, identificadas como *T. brasiliensis brasiliensis*, *T. brasiliensis macromelasoma*, *T. juazeirensis* e *T. melanica*; Dujardin et al. (1987) encontraram evidências enzimáticas que indicam processo de especiação entre *T. infestans* silvestres e domésticos na Bolívia; Garcia et al. (1995a) avaliaram o polimorfismo de enzimas em colônias de *T. infestans*; Jurberg et al. (1998), propuseram a validação da espécie *T. garciabesi* da então sinonímia *T. sordida*; e Noireau et al. (2002), que por meio de eletroforese de isoenzimas avaliaram espécies do complexo *oliveirai*.

Nos últimos anos, estudos abordando aspectos moleculares vêm tentando esclarecer dúvidas relacionadas à filogenia dos triatomíneos (García et al., 1995b, 2001; Marcilla et al., 2001; Hypsa et al., 2002; Noireau et al., 2002; Martinez et al., 2006; Mendonça et al. 2009). Nessa temática cita-se também o trabalho de Naegele et al. (2006), que utilizando a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorfism - Polymerase Chain Reaction* (PCR-RFLP) mostraram a possibilidade de distinção de quatro espécies de *Rhodnius*, gênero que apresenta muitas dificuldades para a identificação de suas espécies.

A revisão taxonômica de Lent e Wygodzinsky (1979) reuniu descrições, re-descrições e chaves dicotômicas, lançando, assim, as primeiras tentativas que consideram o relacionamento filogenético entre os triatomíneos e seus possíveis grupos irmãos. No entanto, a sugestão de origem monofilética dos Triatominae já havia sido levantada por Usinger, em 1944. Atualmente Hypsa et al. (2002) têm reforçado a hipótese de monofilia entre os triatomíneos que, por meio de análises moleculares, propôs sua evolução a partir de ancestrais predadores, grupo desconhecido, por falta de registro fóssil (Lukashevich e Mostovski, 2003).

Schofield (1988), baseando-se em aspectos biogeográficos e ecológicos, sugeriu que a origem desse grupo seria derivada de diversas linhagens de reduviídeos, apoiando então a proposta de origem polifilética dessa subfamília. Outros autores tais como Gorla et al. (1997) e Dujardin et al. (2000) apóiam sua proposta.

Em uma revisão, Harry et al. (1998) sugerem a grande utilidade dos marcadores moleculares em estudos entomológicos de genética populacional e podem auxiliar nos programas de controle, ao localizar marcadores no genoma dos triatomíneos.

Vários estudos ajudam a elucidar questões filogenéticas sobre os triatomíneos sul-americanos, usando marcadores moleculares do DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear (nDNA). Os marcadores mais utilizados do mtDNA são os fragmentos que originam as subunidades ribossomais 12S e 16S, citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (Cytb), todos com várias sequências já depositadas em banco de dados (NCBI, 2009). O mtDNA não sofre recombinação e apresenta uma taxa de evolução 10 vezes maior que o nDNA, tornando-se, assim, uma excelente ferramenta filogenética para a separação de espécies crípticas (Hypsa et al., 2002; García et al., 2001; Martinez et al., 2006).

De acordo com a análise combinatória das sequências dos fragmentos 16S e 12S, espécimes de *T. sordida* originários da Argentina são fortemente relacionadas a exemplares de *T. sordida* e *T. matogrossensis* coletados no Brasil. Essas duas espécies são bem distintas

morfologicamente e, apesar das semelhanças genéticas, pertencem a clados distantes e cada espécie pertence a um complexo distinto (García et al., 2001; Schofield e Galvão, 2009).

As inferências filogenéticas podem ser sugeridas por meio do perfil de alinhamento entre sequências de DNA, onde se verificam regiões de similaridade e indicam se as sequências são homólogas (que apresentam mesma origem evolutiva – com um ancestral em comum) ou não (Phillips et al., 2000; Brown, 2000).

As relações filogenéticas da subfamília Triatominae ainda são muito discutidas e nem todas as espécies foram estudadas com base em marcadores moleculares, assim, muitas autapomorfias ainda geram controvérsias (Carcavallo et al., 1999; Schofield e Galvão, 2009).

Essa subfamília apresenta cinco tribos: a Alberproseniini, com o gênero *Aberprosenia*; a *Bolboderini*, com *Belminus*, *Bolbodera*, *Microtriatoma* e *Parabelminus*; a *Cavernicolini*, com *Cavernicola*; a *Rhodniini*, com *Psammolestes* e *Rhodnius*; *Triatomini*, com os gêneros *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Hermanlenticia*, *Linshcosteus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma* e *Triatoma*.

Entre os triatomíneos ocorre uma evidente separação das espécies do Novo e Velho Mundo. A grande maioria encontra-se nas Américas, enquanto apenas dois gêneros ocorrem no continente indiano, e no Sul e Sudeste da Ásia, com cinco espécies de *Linshcosteus* e oito espécies de *Triatoma* do complexo *rubrofasciata* (Schofield, 1988, 2000; Ceretti Júnior et al., 2008).

As espécies de Triatominae podem ser agrupadas em complexos específicos de acordo com semelhanças morfológicas e distribuição geográfica, possibilidade de hibridação e proximidade molecular. Por possibilitar várias abordagens, de acordo com o parâmetro avaliado, até o momento não há um consenso para a padronização do agrupamento em grupos, complexos e subcomplexos (Usinger et al., 1966; Lent e Wygodzinsky, 1979; Schofield e Galvão, 2009). Hypsa et al. (2002) avaliou 57 espécies de Triatominae e, a partir de sequenciamento de DNA e análises filogenéticas, conseguiu separar essas espécies em três grandes grupos: as espécies de *Rhodnius*, as espécies de *Triatomini* norte andinas, e as espécies da América do Sul.

2.2 - O gênero *Triatoma*

O gênero *Triatoma* é o mais numeroso, apresenta 80 espécies, que são atualmente subdivididas em grupos, complexos e subcomplexos (Schofield e Galvão, 2009). Esses

autores dividem as espécies do gênero *Triatoma* em três grupos: o Rubrofasciata, com a maioria das espécies da América do Norte e do Velho Mundo – com os complexos *Phyllosoma*, *Flavida* (= *Nesotriatoma*), *Rubrofasciata*, *Protracta* e *Lecticularia*; o Díspar, com as espécies dos Andes, que inclui o complexo *Dispar*; e o Infestans que compreende as espécies da América do Sul e apresenta os complexos *Infestans* e *Spinolai* (= *Mepraia*).

O complexo *Infestans* apresenta seis subcomplexos, *brasiliensis*, *infestans*, *maculata*, *matogrossensis*, *rubrovaria* e *sordida*. Em 1999, Carcavallo et al. Reuniram, em um grupo denominado complexo *matogrossensis*, as espécies *T. matogrossensis* Leite e Barbosa, 1953, *T. williami* Galvão et al., 1965; *T. guazu* Lent e Wygodzinsky, 1979 e *T. jurbergi* Carcavallo et al., 1998.

Em 2001, Carcavallo et al. descrevem uma espécie nova, *T. klugi*, e a incluem nesse complexo, juntamente com *T. baratai* Carcavallo e Jurberg, 2000 e *T. oliveirai* (Neiva et al., 1939). Com isso esse grupo passou a ser conhecido como complexo *oliveirai*, pois geralmente primeira espécie descrita em um grupo, o denomina. Ainda em 2001, Galvão et al. incluíram *T. deaneorum* Galvão et al., 1967 no complexo *oliveirai*.

Com a descrição e inclusão de *T. vandae* Carcavallo et al., 2002 no complexo *oliveirai*, esse passou a agrupar nove espécies: *T. baratai*; *T. deaneorum*; *T. guazu*; *T. jurbergi*; *T. klugi*; *T. matogrossensis*; *T. oliveirai*; *T. vandae* e *T. williami*. Todas essas espécies estão presentes na região Centro-Oeste do Brasil, exceto *T. klugi* e *T. oliveirai*, espécies presentes na região Sul do Brasil (Carcavallo et al., 2001). Dessa forma, a proposta mais recente é de autoria de Schofield e Galvão (2009), que propuseram uma reorganização dos complexos, com base em aspectos moleculares e biogeográficos e excluiu *T. klugi* e *T. oliveirai* do subcomplexo *matogrossensis*.

As espécies avaliadas neste estudo, segundo Schofield e Gaçvão (2009), foram agrupadas em dois subcomplexos pertencentes ao complexo *infestans*: o subcomplexo *matogrossensis* e o *sordida*. As espécies avaliadas *Triatoma baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. williami*, e *T. vandae* pertencem ao primeiro, e apenas *T. sordida* do subcomplexo *sordida*.

2.2.1 – Espécies avaliadas no estudo: aspectos taxonômicos, morfológicos, moleculares e ecológicos.

2.2.1.1 - *Triatoma baratai* Carcavallo e Jurberg, 2000

A espécie *T. baratai* foi descrita a partir de exemplares coletados em ambiente silvestre, na Fazenda São Miguel na Serra da Bodoquena, no município de Bonito, Mato Grosso do Sul (MS), em 1998.

O comprimento médio do macho é de 25 mm, sua coloração geral é preta, com porções amarelas no clavo, no cório e no conexivo dorsal. *T. williami* é a espécie mais próxima de *T. baratai*, com a qual compartilha semelhanças cromáticas. Enquanto *T. williami* apresenta manchas pretas no conexivo dorsal em *T. baratai* essa estrutura é totalmente amarelada (Carcavallo e Jurberg, 2000).

Por ser uma espécie rara e de hábitos silvestres, sua coleta é bastante incomum, e, como *T. baratai* foi descrita recentemente, não apresenta muitos estudos a seu respeito. Em pesquisa realizada no GenBank® (NCBI, 2009), não foi encontrado nenhum gene sequenciado para essa espécie.

2.2.1.2 - *Triatoma costalimai* Verano e Galvão, 1958

Os espécimes utilizados na descrição foram procedentes do município de Taguatinga, no Estado de Goiás (GO). O tamanho médio dos exemplares machos e fêmeas dessa espécie é de 26mm. Sua coloração geral é marrom escura, com porções avermelhadas no cório e no conexivo.

A espécie foi assinalada pela segunda vez na literatura por Mello e Borges (1981), pela identificação de vários exemplares encontrados em locas de pedras de formação calcária em mata ciliar no município de Mambaí-GO. Lorosa et al. (1999) apontam roedores, gambás, lagartos, cavalos, tatus e aves como as principais fontes alimentares de *T. costalimai*. A biologia de *T. costalimai* foi estudada por Isac et al. (2000).

Em uma mesma localidade foram encontrados exemplares de *T. costalimai*, roedores e marsupiais infectados com *T. cruzi*, esse fato sugere a participação ativa dessa espécie de triatomíneo no ciclo de transmissão silvestre do *T. cruzi* (Mello e Borges, 1981; Mello, 1982).

Já existem sequências de *T. costalimai* depositadas no GenBank® , duas do fragmento 16S, uma sem referência da origem do exemplar e outra de um exemplar proveniente de GO; e duas do 12S um exemplar proveniente de GO, ambos fragmentos do mtDNA (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004; NCBI, 2009).

2.2.1.3 – *Triatoma guazu* Lent e Wygodzinsky, 1979

A espécie *T. guazu* foi descrita baseada apenas em uma fêmea (holótipo) coletada em 1934, em Villarica, no Paraguai. Essa espécie caracteriza-se por apresentar comprimento médio de 30 mm, coloração em geral negra com porções amareladas, e cabeça negra e rugosa.

O macho foi descrito por Lent et al. (1996), ao analisar exemplares coletados em domicílios na localidade de Barra do Garça, no Estado de Mato Grosso (MT). Essa descrição foi feita com ênfase nas estruturas fálicas. Esses espécimes apresentaram comprimento médio de 26 mm, cabeça preta com pequenos grânulos, colorido geral preto, com manchas amarelas nos lados do pescoço, no cório dos hemélitros e em faixas do conexivo. Essa espécie é adaptada ao ambiente peridoméstico, porém é raramente coletada.

Estudos morfológicos, por meio de microscopia eletrônica de varredura, foram realizados por Galindez-Girón et al., em 1997, que analisaram exemplares mortos coletados no intradomicílio em Barra do Garça, no ano de 1994. Esse estudo ampliou o conhecimento morfológico dessa espécie, permitindo abordagens intra e interespecíficas, podendo ser incluída em chaves dicotômicas.

Alguns fragmentos do DNA mitocondrial foram sequenciados para *T. guazu* e disponibilizados no GenBank®, sendo duas sequências do 16S, uma sem referência da origem do exemplar; e outra relativa a um exemplar cedido pelo Instituto Oswaldo Cruz – IOC; e uma do 12S, a partir de um exemplar cedido pelo IOC, também procedente de Barra do Garça – MT (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004; NCBI, 2009).

2.2.1.4 - *Triatoma matogrossensis* Leite e Barbosa, 1953

Triatoma matogrossensis foi descrito, e apresenta-se distribuída pelos Estados de MT e MS. Observa-se a coleta de exemplares dessa espécie em habitat doméstico e peridoméstico, podendo estar relacionados à transmissão da doença de Chagas em vários municípios da Região Centro-Oeste (Silveira et al., 1984; Carcavallo e Martínez, 1985; Lent e Wygodzinsky, 1979).

Os exemplares machos dessa espécie variam entre 24,5 e 28 mm de comprimento, e as fêmeas, entre 28 e 30 mm. Sua coloração geral varia de marrom escuro a marrom avermelhado escuro com porções amareladas nas pernas, conexivo e pronoto (Lent e Wygodzinsky, 1979).

Para *T. matogrossensis* se encontram disponíveis no GenBank® algumas sequências de genes, sendo três sequências para o 16S, uma sem relação à procedência e duas relativas a exemplares vindos do Serviço Nacional de Chagas de Córdoba, na Argentina (SNC); e duas para o 12S, uma sem relação à procedência e outra de espécimes vindos do SNC, coletados em MT (Garcia et al., 2001; Hypsa et al., 2002; NCBI, 2009).

2.2.1.5 - *Triatoma sordida* (Stål, 1859)

Essa espécie foi descrita originalmente como *Conorhinus sordidus* Stål, 1859, foi classificada como *Eutriatoma sordida* por Pinto em 1931 e Chagas em 1912, a inclui no gênero, *Triatoma* (Neiva e Lent, 1943; Lent e Wygodzinsky, 1979).

Triatoma sordida apresenta como centro de dispersão a região do cerrado brasileiro (Forattini, 1980). Morfologicamente essa espécie é caracterizada por apresentar exemplares machos com comprimento variando entre 14 e 19 mm, e fêmeas entre 15 e 20 mm, além de coloração castanho clara, raramente escura, com manchas pretas em forma de nota musical no conexivo (Jurberg et al., 1998).

Predominantemente encontrada no peridomicílio e intradomicílio, *T. sordida*, apresenta vasta distribuição geográfica. No Brasil já foi localizada em vários Estados (BA, GO, MA, MT, MS, MG, PR, PB, PI, RS, SC e SP), bem como na Argentina, Paraguai, Uruguai e ocorre ainda em ambiente silvestre no leste da Bolívia (Abalos e Wygodzinsky, 1951; Lent e Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 1988; Pires et al., 1999, Peñaranda-Carrillo et al., 2002). No ambiente silvestre, *T. sordida* é encontrada em uma grande variedade de ecótopos, principalmente arborícolas (ninhos de aves, ocos de árvores e palmeiras), e também embaixo de pedras nos Andes bolivianos. Seu ciclo biológico varia entre 115 e 240 dias (Jurberg et al., 2004).

Essa espécie substitui frequentemente o *T. infestans* em ambientes peridomiciliares (Jurberg et al., 2004; Soares et al., 1996) e foi encontrada principalmente em ambientes peri e intradomiciliares nos Estados de Mato Grosso do Sul e de Goiás, com uma taxa de infecção pelo *T. cruzi* de 0,2 e 0,6%, respectivamente (Oliveira e Silva, 2007; Almeida et al., 2008).

Assim, *T. sordida* apresenta-se como uma espécie de grande importância epidemiológica (Peñaranda-Carrillo et al., 2002). Corrobora essa afirmação o isolamento de 12 cepas de *T. cruzi* a partir de exemplares de *T. sordida* coletados no peridomicílio de uma residência em Santo Inácio, na Bahia (Rosa et al., 2004).

Alguns genes já estão sequenciados para *T. sordida* e estão disponíveis no GenBank®, dentre essas sequências, uma do Cytb, de um exemplar coletado em Cochabamba, Bolívia; três sequências do 16S, três do COI, e três do 12S, sendo duas referentes a exemplares de Guaíra-SP e uma de Colonia Pando, Corrientes, na Argentina, para cada fragmento, além de outras sequências gênicas, inclusive do DNA nuclear (Lyman et al., 1999; Garcia et al., 2001; NCBI, 2009).

2.2.1.6 - *Triatoma vandae* Carcavallo et al., 2002

Essa espécie foi descrita a partir de espécimes silvestres coletados no município de Itiquira, no Estado do Mato Grosso. Sua biologia e ecologia foram descritas por Noireau et al. (2002).

Os espécimes machos dessa espécie apresentam em média 27,6 mm de comprimento e as fêmeas 29,5 mm, com coloração geral castanho-amarelado com as pernas uniformemente amareladas (Carcavallo et al., 2002).

T. vandae é morfologicamente próxima de *T. jurbergi*, apresentam semelhanças cromáticas com *T. williami* e *T. baratai*, todas pertencentes ao subcomplexo *matogrossensis* (Carcavallo et al., 2002; Schofield e Galvão, 2009). Noireau et al. (2002) por meio de estudos morfométricos e isoenzimáticos, aproximou essa espécie de *T. jurbergi* e *T. matogrossensis*.

Por ser uma espécie recentemente descrita, *T. vandae* não apresenta muitos estudos a seu respeito. Em pesquisa realizada no GenBank® (NCBI, 2009), até o momento, não foram encontrados genes sequenciados para essa espécie.

2.2.1.7 - *Triatoma williami* Galvão et al., 1965

A descrição de *T. williami* foi baseada em espécimes capturados em uma fazenda, no município de Piranhas, no Estado de Goiás. Essa espécie se caracteriza por apresentar cores variando entre o marrom escuro e o preto com manchas amarelas no pescoço e no conexivo, os machos apresentam tamanho médio entre 25,0 e 25,5 mm e a fêmea entre 26 e

28 mm. É uma espécie endêmica dos Estados de Goiás e Mato Grosso (Lent e Wygodzinsky, 1979).

Geralmente essa espécie é encontrada em peridomicílio e domicílio nos Estados de Goiás e Mato Grosso (Carcavallo et al., 1998b). O ciclo evolutivo de *T. williami* foi estudado por Silva et al., em 1997, com a finalidade de se conhecer alguns aspectos biológicos e adaptativos a fim de avaliar sua capacidade de se desenvolver em ambiente criado pelo homem, e sua potencialidade de replicar e transmitir o *T. cruzi*. Até o momento seu habitat silvestre é desconhecido (Silva et al., 2005a).

Alguns genes já estão sequenciados para *T. williami*, e se apresentam disponíveis no GenBank®, sendo duas sequências do 16S, uma de exemplares vindo do IOC, coletados em Barra do Garça, MT e a outra sem referência a procedência; e uma do 12S, de um exemplar de Barra do Garça - MT – IOC (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004; NCBI, 2009).

2.3 - Justificativas

No presente estudo foi avaliada a relação filogenética entre sete espécies de *Triatoma*, encontradas na região Centro-Oeste do Brasil, com base em análises moleculares de sequências de DNA de dois fragmentos dos genes mitocondriais Cytb e 16S.

Exceto *T. sordida* do subcomplexo *sordida*, as demais pertencem ao subcomplexo *matogrossensis*: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. vandae* e *T. williami* (Schofield e Galvão, 2009). Além de terem sua área de dispersão situada principalmente nos domínios do cerrado e pantanal, que engloba principalmente a região Centro-Oeste do Brasil, essas espécies apresentam morfologia bastante semelhante, o que dificulta a diferenciação das mesmas (Lent e Wygodzinsky, 1979; Forattini, 1980; Carcavallo et al., 2002; Noireau et al., 2002).

Duas das espécies estudadas, *T. baratai* e *T. vandae* não apresentam, até o momento, estudo filogenético que se baseie na análise de sequências de DNA. No GenBank®, não há referência de genes sequenciados para essas espécies (NCBI, 2009).

Apesar de ser morfologicamente distinta, *T. sordida* foi escolhida para este trabalho, pois de acordo com Forattini (1980) esta espécie apresenta como centro de endemismo e dispersão a região do Araguaia no cerrado brasileiro. *Triatoma sordida* destaca-se também pela sucessão ecológica evidenciada por ocupar nichos anteriormente ocupados

por *T. infestans*. As medidas de controle vetorial ofereceram forte pressão contra a domiciliação de *T. infestans* e atualmente é raro o encontro dessa espécie próximo aos domicílios humanos (Diotaiuti et al., 1995; Silva et al., 2005a).

Outro motivo para a inclusão de *T. sordida* nesse trabalho é o fato de alguns autores já terem relatado que essa espécie se relaciona fortemente a *T. matogrossensis*, quando analisados dados moleculares, apesar de serem bastante distintas morfológicamente (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004).

3 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivos Gerais

Propor relações filogenéticas entre sete espécies de *Triatoma* que ocorrem na região Centro-Oeste do Brasil, com base em análise de fragmentos de genes mitocondriais.

3.2 – Objetivos Específicos

Sequenciar os fragmentos citocromo b e 16S do mtDNA, para seis espécies do subcomplexo *matogrossensis*: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. vanda* e *T. williami*; e uma do subcomplexo *sordida*: *T. sordida*.

Avaliar a qualidade das sequências geradas.

Propor relações filogenéticas baseadas nos fragmentos sequenciados, para comparar as espécies estudadas com outras espécies de Triatominae que já possuem sequências disponíveis em banco de dados (GenBank®).

Determinar a posição filogenética de *T. baratai* e *T. vanda*, por meio dos fragmentos citocromo b e 16S do mtDNA, tendo em vista que, na literatura, não há informações relativas as sequências dessas duas espécies.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Fluxograma de estudo

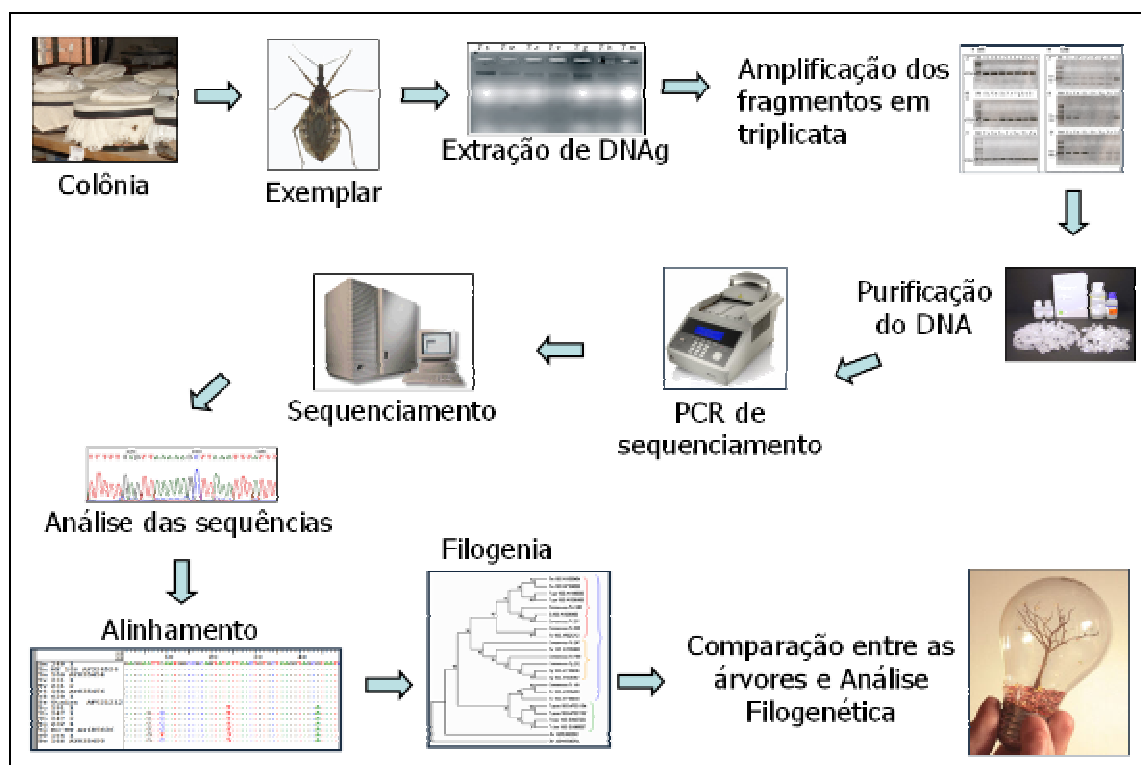


Figura 02: Fluxograma de estudo, no qual se observa a sequência das etapas desenvolvidas.

4.2 – Exemplos

Os exemplares utilizados foram retirados de colônias identificadas e numeradas com algarismos arábicos como “Colônia de Triatomíneos de Araraquara” (CTA) que se encontram no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual Paulista - Campus de Araraquara (FCF-UNESP/Araraquara). Inicialmente esse insetário foi instituído pelo Prof. Dr. Oswaldo Paulo Forattini na Faculdade de Saúde Pública (USP - São Paulo) em 1967, no ano de 1983 foi transferido para o Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maria Soares Barata. Em janeiro de 2008, esse insetário foi doado para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa. As

informações e ilustrações relativas às espécies estudadas estão referidas a seguir (Fig. 03 e Tab. 01).

Os exemplares de *T. baratai* são provenientes da colônia de código CTA 247, iniciada a partir de espécimes coletados por Romão Larson, em 10 de agosto de 2007, no município de Nioaque, no Estado de Mato Grosso do Sul. Os primeiros exemplares foram cedidos por Dayse da Silva Rocha e Vanda Cunha do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz - RJ (LNIRTT - Fiocruz), em agosto de 2007.

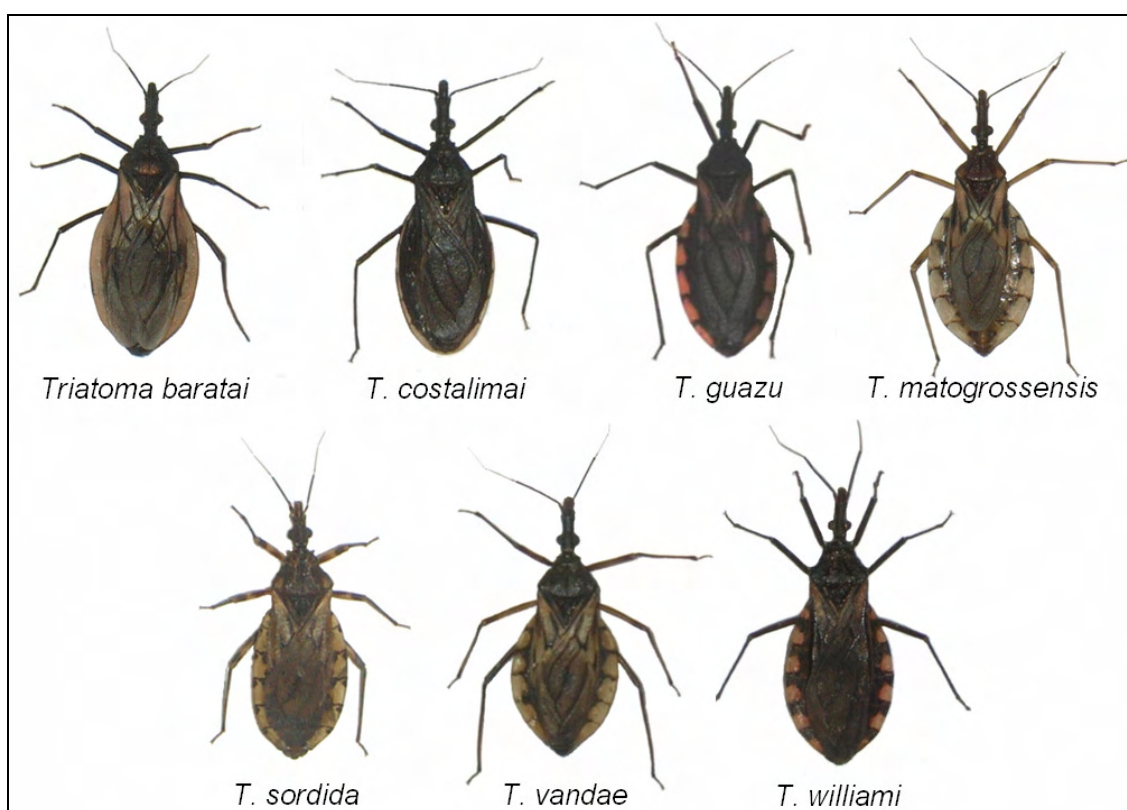


Figura 03: Exemplares das espécies estudadas. Todas as espécies estão evidenciadas por exemplares fêmeas, exceto *T. costalimai*, que é um macho. Fotos de Sueli Gardim.

Foram utilizados indivíduos de *T. costalimai* da colônia identificada como CTA 191, iniciada a partir de exemplares coletados no município de Mambá, no Estado de Goiás, em 17/03/1996.

Os exemplares da espécie *T. guazu* são oriundos do município de Barra do Garça, no Estado de Mato Grosso, mantidos desde 27/07/2001 em uma colônia de código CTA-232, cedidos em 27/07/2001, por Dayse da Silva Rocha.

Os indivíduos da espécie *T. matogrossensis* são oriundos do município de Rio Verde no Mato Grosso do Sul e mantidos desde 03/05/2007, em colônia de código CTA 248, cedidos em 24/08/2007, por Dayse da Silva Rocha.

Os espécimes de *T. sordida* são provenientes de uma colônia (CTA 028), originada a partir de exemplares coletados no município de Brasilândia, no Estado de Mato Grosso do Sul, em 09/08/1982. Mesmo sendo uma espécie mantida há bastante tempo em colônia, a sua utilização se justifica devido à dispersão na região Centro-Oeste do país.

Os exemplares de *T. vandae* utilizados vieram de uma colônia identificada como CTA 231, iniciada a partir de exemplares coletados em 27/07/2001, na Fazenda Urutal, em Itiquira, no Pantanal do Mato Grosso, e foram doados por Vanda Cunha, em 27/07/2001.

A colônia de *T. williami* é mantida no insetário com código CTA-184, iniciada a partir de exemplares coletados em dezembro de 1995, no município de Barra do Garça no Estado de Mato Grosso.

Tabela 01: Origem e início das colônias estudadas.

Espécie	Colônia	Origem	Início da colônia
<i>Triatoma baratai</i>	CTA 247	Nioaque - MS	10/08/2007
<i>Triatoma costalimai</i>	CTA 191	Mambaí - GO	17/03/1996
<i>Triatoma guazu</i>	CTA 232	Barra do Garça - MT	27/07/2001
<i>Triatoma matogrossensis</i>	CTA 248	Rio Verde - MS	03/05/2007
<i>Triatoma sordida</i>	CTA 028	Brasilândia - MS	09/08/1982
<i>Triatoma vandae</i>	CTA 231	Itiquira - MT	27/07/2001
<i>Triatoma williami</i>	CTA 184	Barra do Garça - MT	12/1995

4.3 - Extração do DNA genômico:

As etapas que envolvem metodologias moleculares foram desenvolvidas em parceria com a Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, responsável pelo Laboratório de

Biologia Molecular de Parasitos, do Departamento de Ciências Biológicas, da FCF-UNESP/Araraquara.

A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico (DNAg) dos exemplares foi proposta por Sambrook e Russell (2001), modificada e está descrita a seguir.

A partir de um exemplar de cada colônia, conservado em álcool absoluto ou recém eutanaziado com clorofórmio, foram extraídas cuidadosamente do tórax as seis pernas e sua musculatura. Essas estruturas foram colocadas em tubos plásticos de 1,5 mL e trituradas utilizando uma ponteira e congelamento com nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 400µl de solução de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% de SDS) e o material foi novamente triturado com uma ponteira. Adicionou-se 100µL de proteinase K (500µg/ml) e, após homogeneização, incubou-se em “banho Maria” a 55°C por 4 horas.

Adicionou-se 500µl de fenol:clorofórmio (24:1) e centrifugou-se a 14000 g, por três minutos. A fase aquosa sobrenadante foi transferida para outro tubo, no qual se adicionou 2µl de RNase (10µg/100ml) a mistura foi incubada a 37°C, por uma hora. Após esse período foi adicionado 400 µl de fenol:clorofórmio (24:1) e centrifugado a 14000 g, por três minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para um tubo novo, no qual se adicionou 400µl de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e seguiu com centrifugação a 14000 g, por três minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf com 40 µl de acetato de amônio 4M e 1 mL de etanol absoluto gelado, e foi centrifugado a 14000 g, por dez minutos a 4°C, com o descarte da fase aquosa. O *pellet* foi ressuspenso em 400µl de etanol 70% gelado e centrifugado a 14000 g, por dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a vácuo.

O DNA precipitado foi ressuspendido em 100µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6 + 1mM EDTA) e acondicionado em geladeira (2-8°C) até o uso.

A estimativa da quantidade e do tamanho do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A corrida do gel horizontal foi orientada por um campo elétrico constante. Cada amostra de DNA corre por aproximadamente 20 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 (conjugado ao brometo de etídeo) foi observada em luz ultravioleta (Sambrook e Russell, 2001).

4.4 - Iniciadores:

Os iniciadores (*primer*) utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes foram os mesmos propostos por Lyman et al. (1999).

Citocromo b:

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

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

16S: F: 5' – CRC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3'

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

4.5 - Amplificação dos fragmentos por PCR:

Para as reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) foi utilizado o termociclador Gene Amp® PCR System 9700 - Applied Biosystems™. A amplificação dos fragmentos de interesse, tanto para o fragmento 16S, como para o Cytb, foram realizadas utilizando a seguinte condição de reação:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
 - desnaturação (94°C, por 45 segundos)
 - anelamento (50°C, por 45 segundos)
 - extensão (72°C, por 1 minuto),
 - extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.
- } 40 ciclos

Para a amplificação dos fragmentos de mDNA utilizou-se 1µl de cada par de *primer*, 1µl DNTP, 0,5µl de Taq polimerase de alta fidelidade (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity – Invitrogen) com sua respectiva solução tampão e cloreto de magnésio, 3µl de DNAg e água deionizada para completar o volume de 50µl. O produto da PCR foi estocado em freezer (-20°C).

Os iniciadores foram ressuspensos em água deionizada estéril, obtendo uma concentração final de 10,0 picomols para amplificação dos fragmentos, e de 1,6 picomols na reação de sequenciamento.

Cada amostra foi avaliada em triplicata, sendo que, para cada exemplar, foram realizadas três PCRs independentes e o produto resultante destas PCRs foram sequenciados.

4.6 – Purificação do DNA amplificado

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (*GE Life Sciences*), de acordo com as instruções do fabricante, para sua posterior utilização na reação de sequenciamento.

4.7 - Sequenciamento:

O fragmento de DNA purificado foi submetido a uma reação de sequenciamento, utilizando *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (*Applied Biosystems*). Utilizou-se de 4µL do DNA purificado, 2µL de *primer* F ou R, 3,5µL de tampão *Save Money* (200mM Tris-HCl, pH 9; 5,0mM MgCl₂) e 0,5µL de *BigDye* e água deionizada estéril para completar 20 µL. Cada reação utiliza apenas um *primer*, ou seja, são realizadas duas reações separadas, uma utilizando o *primer* F e outra o R.

O produto da PCR de sequenciamento foi precipitado pela adição de 80µL de Isopropanol 75% (*LabSynty*), transferido para novo tubo plástico de 1,5mL e conservados em temperatura ambiente, por 15 minutos, ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 14000 g, por 15 minutos, em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 1mL de etanol 70% para lavar as amostras, centrifugando-as novamente por 5 minutos, a 14.000 g. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram incubadas a vácuo por 15 minutos para secarem e estocadas em freezer até o uso.

As amostras foram ressuspensas em 2µL de *Loading Buffer* (mistura composta por 12,3µL de *Odd Lane Loading Color* (*Applied Biosystems*) e 57,7µL de formamida) e processadas em sequenciador automático, *ABI PRISM® 377 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*).

4.8 - Análise filogenética:

A qualidade das sequências foi avaliada pelo eletroferograma e os alinhamentos e as sequências consenso foram realizados com o auxílio dos programas BioEdit Alignment Editor e ClustalW Multiple Alignment.

Os alinhamentos foram realizados em três etapas: alinhamento inicial (AI), no qual foi extraída uma sequência consenso a partir das sequências R e F obtidas para cada fragmento sequenciado, sendo três para cada espécie (triplicata); alinhamento por espécie (AE), consenso obtida a partir do alinhamento das sequências AI de cada espécie, sendo,

então, uma sequência para cada espécie; e alinhamento geral (AG), que se baseia no alinhamento das sequências AE com as de Triatominae disponíveis no GenBank® (Fig. 04).

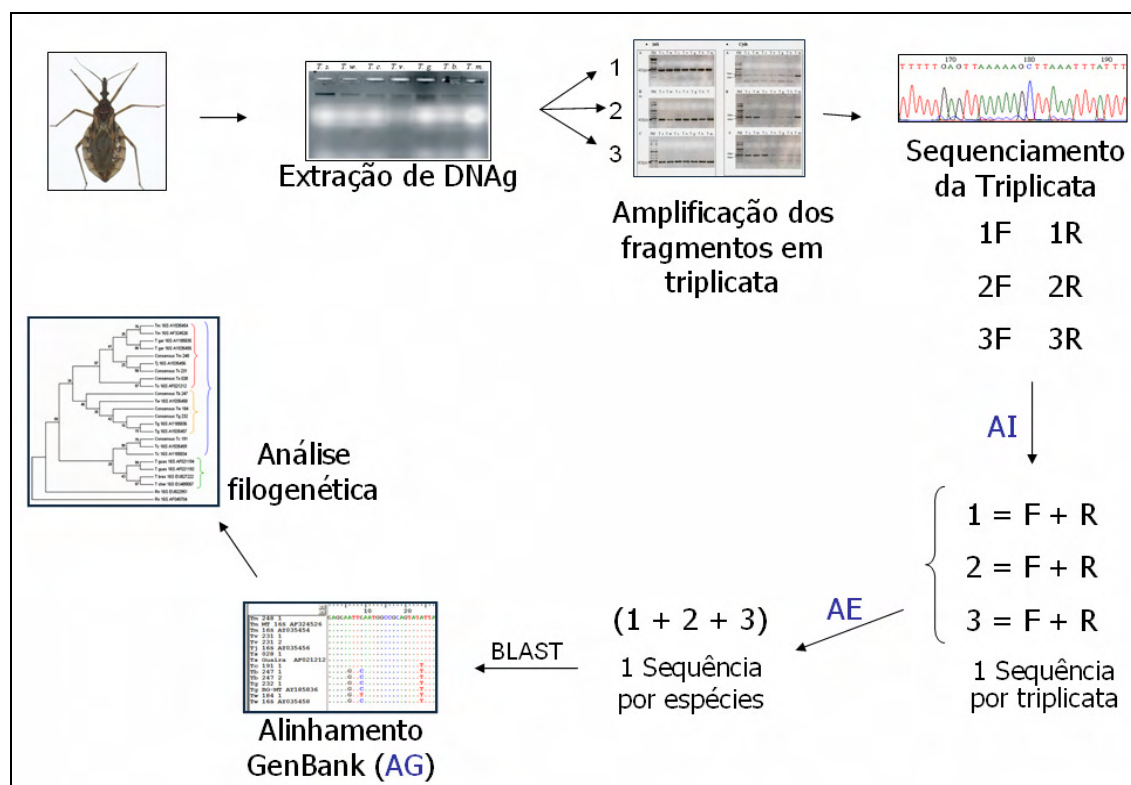


Figura 04: Fluxograma esquemático das três etapas de alinhamento das triplicatas. Alinhamento Inicial (AI), Alinhamento por espécie (AE) e Alinhamento Geral (AG).

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se do programa Mega 4.0.2 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) e os parâmetros analíticos de máxima parcimônia (*Maximum Parsimony* - MP) e de distância (*Neighbor-Joining*- NJ). Para as análises de distâncias foram utilizados dois parâmetros para a construção das matrizes: o Kimura de dois parâmetros (Kimura 2) e o *Maximum Composite Likelihood* (MCL) (Kumar et al., 2005). Os dendrogramas foram gerados pelo programa Mega e os valores de *Bootstrap* foram suportados por 1.000 replicações. Nessas análises utilizou-se do alinhamento AG.

4.9 – BLAST

Com o intuito de certificar se o fragmento sequenciado realmente foi o esperado, utilizou-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível na página do National Center Biotechnology Information (NCBI). Essa ferramenta indica alguns valores de correlação entre a sequência obtida e as depositadas em bancos de dados. Os valores utilizados nesse trabalho foram o de máxima identidade, similaridade e e-value. As sequências utilizadas para comparação no BLAST foram as mesmas obtidas no AE.

4.10 – Mapa dos sítios variáveis.

Com o intuito de avaliar as bases polimórficas, gerou-se um mapa de sítios variáveis, com o auxílio do programa NetWork 4.5, a partir do alinhamento (AG) do fragmento 16S e Cytb. Para isso excluíram-se da análise os grupos externos, utilizados necessariamente para enraizar as árvores geradas.

4.11 – Sequências utilizadas, disponíveis em banco de dados

Neste estudo, foram sequenciados fragmentos de genes mitocondriais de sete espécies de *Triatoma*, e para embasar as análises filogenéticas foram utilizadas sequências dessas e de outras espécies de Triatominae já disponíveis no GenBank® (Tab. 02).

Para as espécies *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. matogrossensis*, *T. sordida* e *T. williami*, além das sequências obtidas neste estudo foram utilizadas algumas já disponíveis em banco de dados. A sequência de *T. jurbergi* foi utilizada, por fazer parte do subcomplexo *matogrossensis*.

Triatoma sordida foi escolhida para este trabalho, pois, de acordo com Forattini (1980), essa espécie apresenta a região do Araguaia, no cerrado brasileiro, como centro de endemismo e dispersão. Pelo fato da inclusão de *T. sordida* nesse estudo, também foram avaliadas outras duas espécies do subcomplexo *sordida*, *T. guasayana* e *T. garciabesi*, como já discutido anteriormente.

O subcomplexo *sordida*, engloba as espécies *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*. *T. guasayana* distribui-se pela Argentina, Bolívia e Paraguai, e posiciona-se filogeneticamente junto a *T. circumaculata*, grupo irmão de *T. rubrovaria* e *T. klugi*, espécies pertencentes ao subcomplexo *rubrovaria*, que compreende espécies da região Sul do Brasil e países próximos. Além disso, todas essas espécies juntam-se em um clado com

T. patagonica, espécie também pertencente ao subcomplexo *sordida* (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004; Schofield e Galvão, 2009).

Tabela 02: Sequências disponíveis no GenBank® , que foram utilizadas nas análises filogenéticas referentes aos fragmentos 16S (A) e Cytb (B).

A

Código de acesso 16S	Espécie	Referências	Procedência
AY185834	<i>T. costalimai</i>	Sainz et al., 2004	GO
AY035459		Hypsa et al., 2002	-
AY035455	<i>T. garciabesi</i>	Hypsa et al., 2002	-
AY185835		Sainz et al., 2004	Salta /Argentina
AY035457	<i>T. guazu</i>	Sainz et al., 2004	MT
AY185836		Hypsa et al., 2002	-
AF021194	<i>T. guasayana</i>	García e Powell, 1998	Santiago del
AF021192			Estero/Argentina
AY035456	<i>T. jurbergi</i>	Hypsa et al., 2002	-
AF324526	<i>T. matogrossensis</i>	Sainz et al., 2004	MT
AY035454		Hypsa et al., 2002	-
AY035458	<i>T. williami</i>	Hypsa et al., 2002	-
AF021212	<i>T. sordida</i>	García e Powell, 1998	Guaira - SP
EU827222	<i>T. brasiliensis</i>	Cereti-Junior et al., 2008	São João do Piauí - Piauí
EU489057	<i>T. sherlocki</i>	Mendonça et al, 2009	Santo Inácio - BA
EU822951	<i>R. neglectus</i>	Cereti-Junior et al., 2008	Guaira -11 SP
AF045704		Lyman et al., 1999	-

B

Código de acesso Cytb	Espécie	Referências	Procedência
AF045730	<i>T. sordida</i>	Lyman et al., 1999	Cochabamba/Bolívia
FJ623064	<i>T. brasiliensis</i>	Harry et al., 2009,	-
EU489058	<i>T. sherlocki</i>	Mendonça et al, 2009	Santo Inácio / BA
AY702023	<i>T. infestans</i>	Giordano et al., 2004	Não publicado
AF045716	<i>R. neglectus</i>	Lyman et al., 1999	-
AF045722	<i>P. megistus</i>	Lyman et al., 1999	-

Já as outras espécies utilizadas nas comparações filogenéticas, *T. sherlocki*, *T. brasiliensis*, e *T. infestans* foram utilizados por já apresentarem sequências disponíveis, relativas aos fragmentos avaliados, e para conferir melhor suporte às análises realizadas, pois representam espécies encontradas na região Nordeste do país.

Para dar suporte aos dendogramas foram utilizados como grupo externo as espécies *Rhodnius neglectus* e *Panstrongylus megistus*, espécies ocorrentes na região Centro-Oeste do Brasil (Forattini, 1980) (Tab. 02).

5 – RESULTADOS

5.1 – Extração do DNA genômico

Com o objetivo de verificar as relações filogenéticas existentes entre sete espécies de *Triatoma* ocorrentes na região Centro-Oeste do Brasil sequenciou-se os fragmentos 16S e Cytb. Para tanto, extraiu-se o DNAG de um exemplar de cada uma das espécies estudadas (Fig. 05).

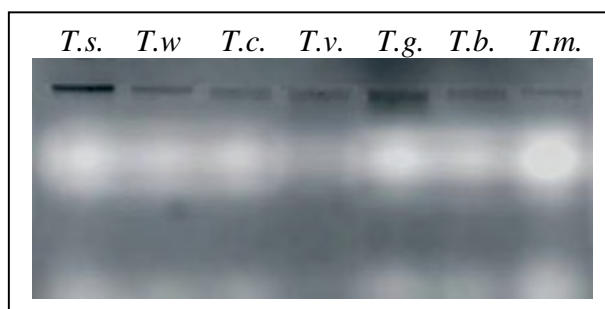


Figura 05: Eletroforese em gel de agarose 1%, corada com brometo de etídio, da extração do DNAG das espécies avaliadas: *T. sordida* (*T.s.*), *T. williami* (*T.w.*), *T. costalimai* (*T.c.*), *T. vanda* (*T.v.*), *T. guazu* (*T.g.*), *T. baratai*, (*T.b.*) e *T. matogrossensis* (*T.m.*).

5.2 – Isolamento (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse

Os fragmentos amplificados foram purificados e avaliados em gel de agarose. O fragmento relativo ao gene 16S apresentou cerca de 400 pares de bases (pb), e ao Cytb em torno de 450pb, o que já era esperado de acordo com os *primers* utilizados (Lyman et al.,1999) (Fig. 06).

5.3 – Sequenciamento

O DNA purificado foi processado em sequenciador automático, ABI 377. A qualidade das sequências foi avaliada por meio da análise do eletroferograma, que considera o tamanho dos picos do gráfico gerado pelo *laser* do sequenciador e os relaciona com o ruído da leitura. Assim quando a leitura gera um gráfico com picos distintos e bem definidos, cada um correspondendo a uma base, pode-se considerar que o sequenciamento da amostra foi satisfatório (Fig. 07). Após avaliação da qualidade das sequências obtidas, as que não apresentaram boa leitura foram submetidas novamente ao processo de sequenciamento.

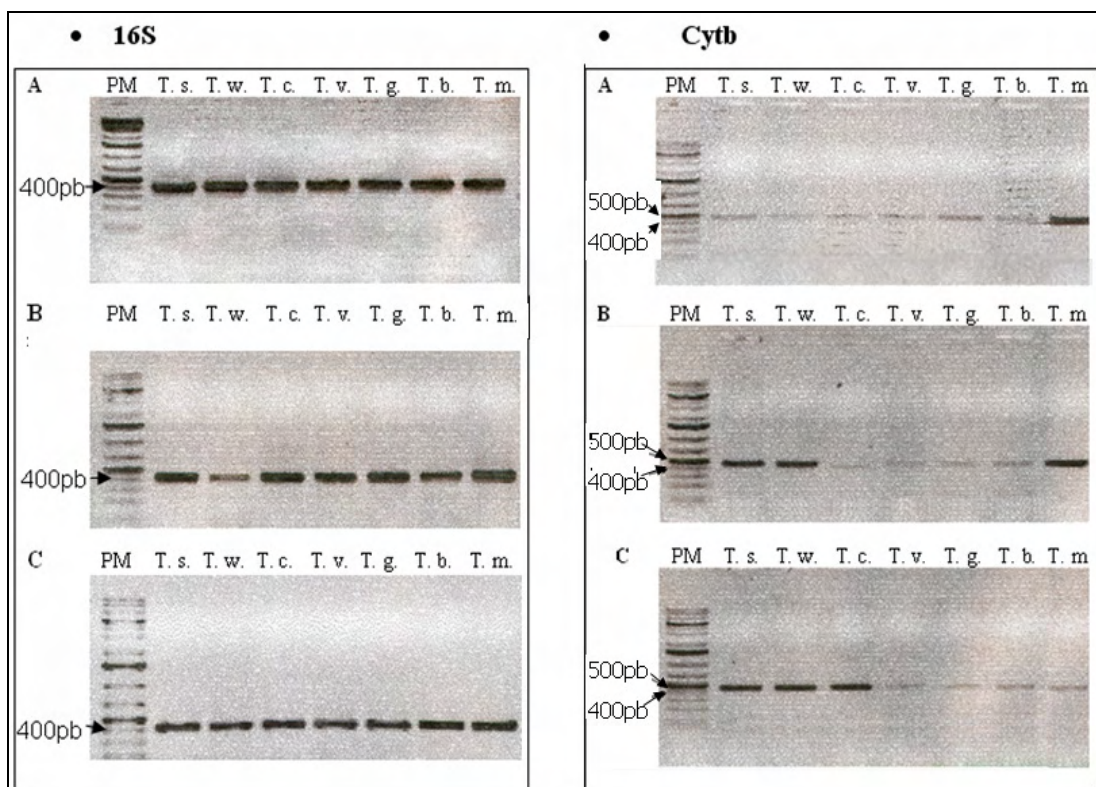


Figura 06: Produto de PCR de isolamento dos fragmentos dos genes 16S (~400pb) e Cytb (~450pb), em triplicata (A, B e C) para as espécies: *T. sordida* (T.s.), *T. williami* (T.w.), *T. costalimai* (T.c.), *T. vandae* (T.v.), *T. guazu* (T.g.), *T. baratai* (T.b.) e *T. matogrossensis* (T.m.). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Leader Plus (Fermentas).

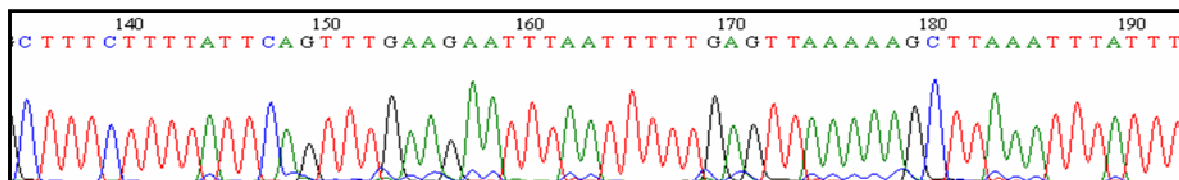


Figura 07: Eletroferograma gerado pelo sequenciador, com picos bem definidos e que representa o padrão de qualidade das sequências do fragmento 16S.

5.4 – Fragmento 16S

5.4.1 – Alinhamento

O alinhamento foi realizado em três etapas (Fig. 04) e as sequências consensos foram geradas com auxílio do programa BioEdit. Os alinhamentos foram obtidos utilizando-se do programa Clustal W.

5.4.1.1 – Alinhamento inicial (AI)

Em uma primeira etapa, foram alinhadas as sequências R e F dos fragmentos de cada uma das espécies estudadas. A partir desse alinhamento foi extraída uma sequência consenso para cada par sequenciado, dessa forma, cada espécie apresentou três sequências (consensos - entre R e F) uma para cada triplicata.

Os fragmentos do gene 16S sequenciados apresentaram entre 305 e 340pb, essa diferença no número de bases sequenciadas deve-se à metodologia aplicada, ou seja, ao fato de realizar o sequenciamento direto dos fragmentos. No entanto, não há comprometimento das análises, pois as sequências geradas no alinhamento inicial (AI) apresentaram fragmentos de 313pb (Fig.08).

5.4.1.2 – Alinhamento por espécie (AE)

Com o intuito de resolver as divergências entre as três sequências geradas para cada espécie, alinharam-se separadamente cada triplicata (AI) e extraiu-se uma segunda sequência consenso. Dessa forma a partir da triplicata de cada espécie, gerou-se uma sequência relativa ao fragmento sequenciado para aquela espécie ou exemplar (AE). A terceira cópia da triplicata de *T. sordida* referente ao fragmento 16S foi perdida ao longo das análises, no entanto utilizou-se das outras duas cópias para gerar a sequência relativa.

5.4.1.3 – BLAST

Para certificar se as sequências obtidas para o fragmento 16S foram realmente as esperadas, utilizou-se a ferramenta BLAST. No BLAST foram utilizadas as sequências obtidas para os fragmentos 16S no AE. Essa ferramenta correlaciona a sequência obtida e as depositadas em bancos de dados. Os valores utilizados nesse trabalho foram os de máxima identidade, similaridade e e-value.

Assim, os valores de máxima identidade indicam a porcentagem de nucleotídeos iguais nas mesmas posições. Os valores de similaridade indicam o grau de homologia (ancestralidade) entre as sequências. Já os valores chamados “e-value” mostram geralmente um valor muito pequeno, assim, quanto menor o valor, menor a probabilidade de as sequências terem sido relacionadas ao acaso e, com isso, apresentam alta probabilidade de serem homólogas:

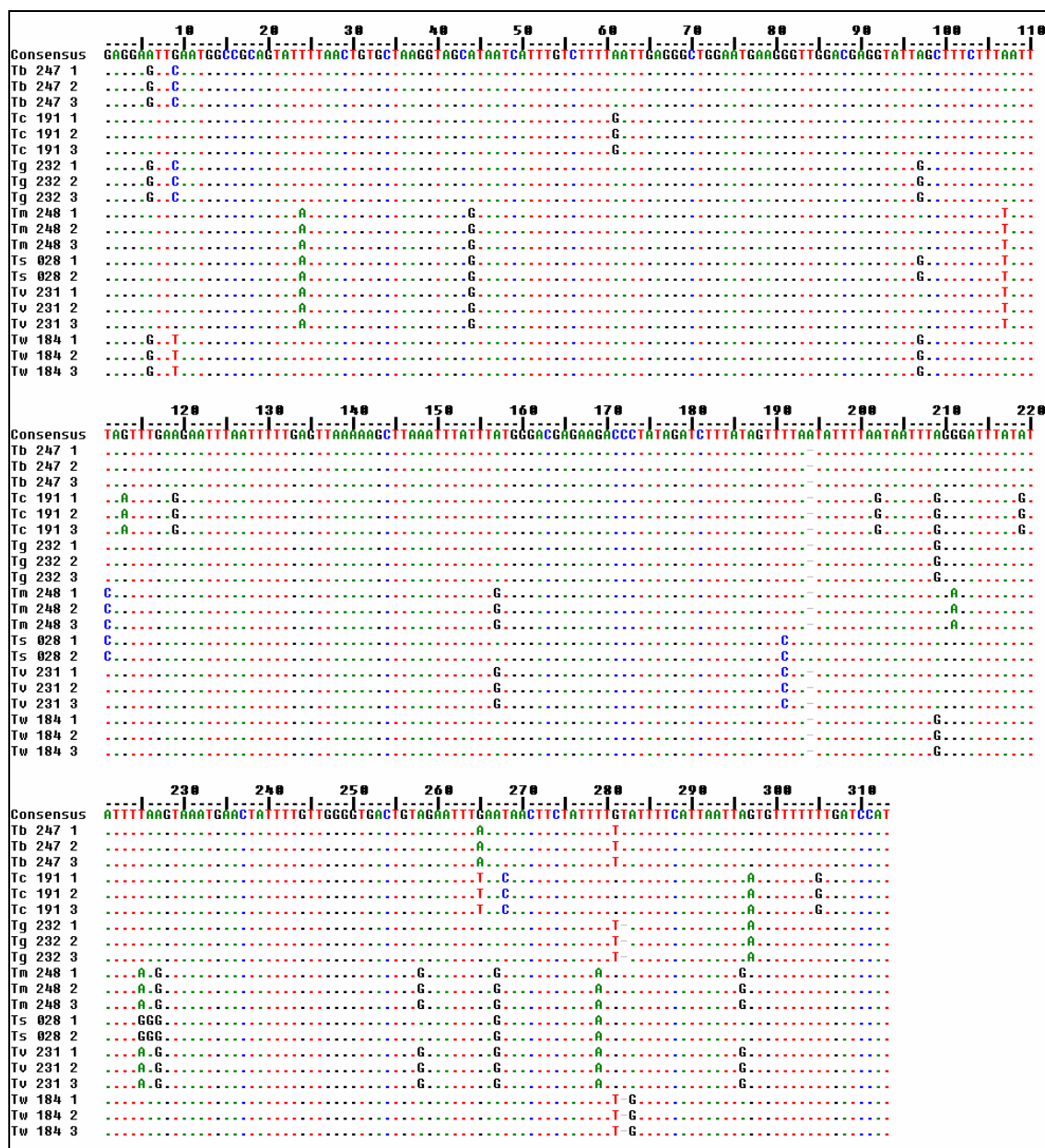


Figura 08: Alinhamento dos 313pb da triplicata das sequências (AI) do fragmento 16S mtDNA. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie, o número da colônia estudada e o número da triplicata: *T. baratai* (Tb), *T. costalimai* (Tc), *T. guazu* (Tg), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sordida* (Ts), *T. vandae* (Tv) e *T. williamsi* (Tw). A primeira sequência apresentada é a sequência consenso (consensus), gerada a partir de todas as outras sequências avaliadas, com a finalidade de indicar com mais clareza os sítios polimórficos.

T. baratai: não apresenta sequência depositada para o gene 16S, desta forma, esta é a primeira vez que esse fragmento é sequenciado. No entanto, com o uso dessa ferramenta, a sequência relativa ao fragmento 16S de *T. baratai* apresentou maior identidade, 98%, com *T. guazu*,

com e-value de $7e-160$, seguida por *T. williami*, com 97%, com e-value de $1e-156$ e $2e-155$. A maior similaridade com a sequência foi relacionada à *T. costalimai*, com 100%.

T. costalimai: a sequência relativa ao 16S dessa espécie apresentou maiores identidades, 99 e 100%, com duas sequências de *T. costalimai* depositadas, com e-value de $9e-169$ e $2e-170$. A maior similaridade foi relacionada à *T. costalimai*, com 100%, seguida por *T. guazu* e *T. Williami*, com 99%.

T. guazu: a sequência relativa ao 16S dessa espécie apresentou maior identidade, 100%, com duas sequências de *T. guazu* depositadas e e-value de $7e-170$. *T. guazu*, *T. williami*, *T. sordida*, *T. garciabesi* e *T. jurbergi* e *T. matogrossensis* apresentaram similaridade de 100% com a sequência avaliada.

T. matogrossensis: o fragmento 16S sequenciado para essa espécie apresentou maior identidade, 98 e 99%, com três sequências de *T. matogrossensis* com e-value de $9e-164$, $2e-164$ e $2e-165$, seguida por *T. jurbergi* e *T. sordida* com 98% com e-value de $4e-162$ e $2e-160$. Com *T. guazu*, *T. williami*, *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. jurbergi* e *T. matogrossensis* apresentaram similaridade de 100%.

T. sordida: o fragmento 16S sequenciado para *T. sordida* apresentou maior identidade, 100% com uma sequência da mesma espécie com e-value de $5e-171$, seguida mais duas sequências de *T. sordida* com 97 e 99% com e-value de $9e-159$ e $2e-169$. Essa sequência mostrou maior similaridade (100%) com *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. matogrossensis*, *T. jurbergi*, *T. guazu* e *T. williami*.

T. williami: a sequência relativa ao 16S dessa espécie apresentou maiores identidades, 99%, com duas sequências de *T. guazu* depositadas, com e-value de $7e-165$, seguida por duas sequências de *T. williami* com 97 e 98% e e-value de $4e-157$ e $1e-161$. A maior similaridade foi relacionada à *T. guazu* e *T. williami*, *T. sordida*, *T. garciabesi* e *T. jurbergi*, com 100%.

T. vanda: essa espécie não apresenta sequência depositada para o gene 16S, dessa forma, esta é a primeira vez que esse fragmento é sequenciado. No entanto com o uso dessa ferramenta a

sequência relativa ao fragmento 16S de *T. vandae* apresentou maior identidade (99%) com *T. jurbergi* com e-value de 9e-164, seguida por três sequências de *T. matogrossensis* com 98% e e-value 4e-162, 1e-162 e 9e-164. Essa sequência apresentou 100% de similaridade com *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. guazu* e *T. williami*.

5.4.1.4 – Alinhamento geral (AG)

Em uma terceira etapa de alinhamentos, as sequências do AE foram alinhadas com sequências do fragmento 16S de espécies de Triatominae disponíveis no GenBank® , apresentando 329pb. Para enraizar as árvores filogenéticas geradas, *Rhodnius neglectus* foi utilizado como grupo externo (Fig. 09).

Com o alinhamento, as regiões polimórficas são facilmente observadas entre as sequências do fragmento 16S. Com o intuito de separar as bases polimórficas das demais, gerou-se um mapa de sítios variáveis, com o auxílio do programa NetWork 4.5, a partir do alinhamento (AG). Para isso excluíram-se os grupos externos, utilizados necessariamente para gerar sítios polimórficos na análise e enraizar as árvores geradas.

Dentre os 329pb alinhados para esse fragmento, podem ser observados 93 sítios polimórficos. Assim, temos 28% da sequência útil como sítios informativos para as construções filogenéticas (Tab. 3).

Algumas das sequências obtidas para o fragmento 16S foram idênticas as que estavam disponíveis no banco de dados, como é o caso de *T. costalimai* e *T. guazu*. As três sequências relativas ao fragmento 16S da espécie *T. guazu* formaram um ramo com divergência nula, bem como as duas sequências de *T. sordida*, o que indica que essas espécies não apresentam variação genética entre si, para os exemplares avaliados (Fig. 10).

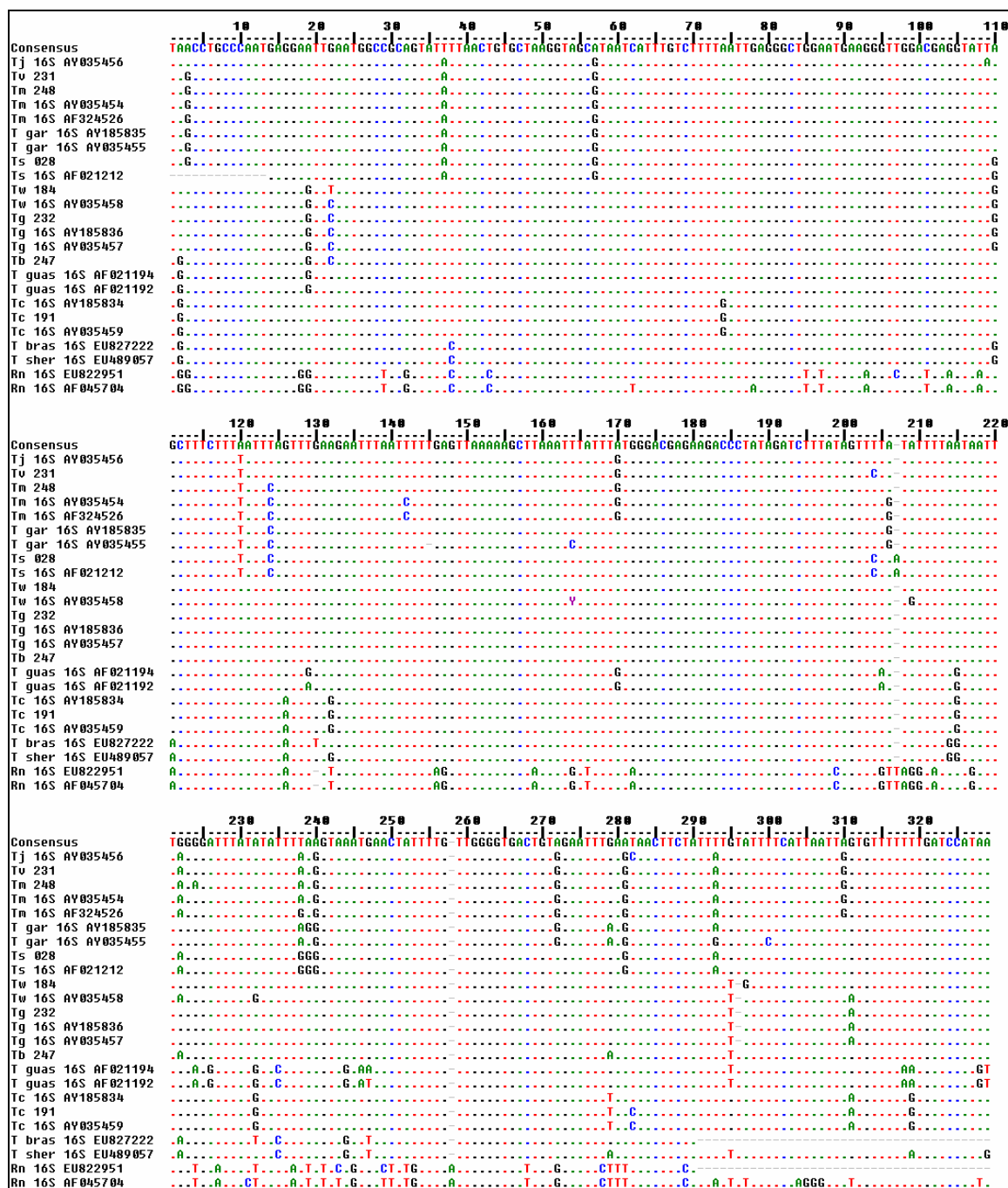


Figura 09: Alinhamento (AG) conduzido pelo programa Clustal W das sequências do fragmento 16S mtDNA (329pb) e de sequências disponíveis no GenBank®, com seus respectivos números de acesso. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie, seguida do número da colônia estudada, ou do número de acesso da sequência: *T. baratai* (Tb), *T. brasiliensis* (T bras), *T. costalimai* (Tc), *T. garciabesi* (T gar), *T. guasayana* (T. guas), *T. guazu* (Tg), *T. jurbergi* (Tj), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sherlocki* (T sher), *T. sordida* (Ts), *T. vandae* (Tv), *T. williami* (Tw) e *Rhodnius neglectus* (Rn).

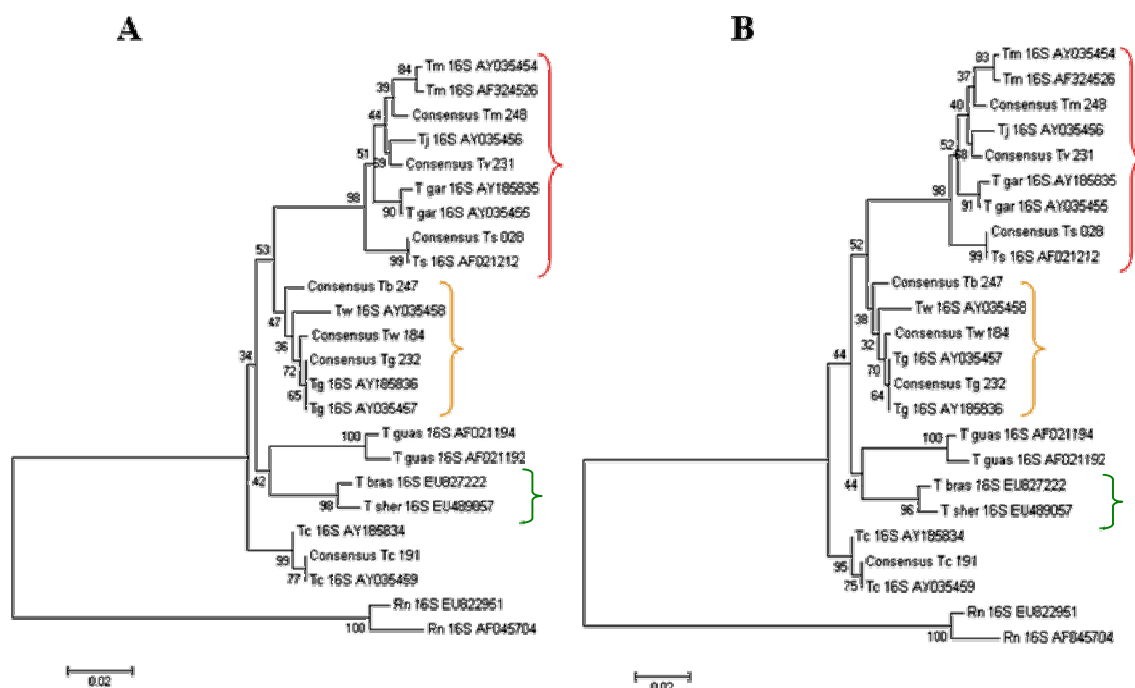


Figura 10: Dendogramas filogenéticos baseados nas sequências da região 16S do mtDNA utilizando a análise NJ, (A) com o modelo “Kimura de dois parâmetros” (Kimura-2) e (B) com o modelo da “Maximum Composite Likelihood” (MCL). Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada, ou após o nome da espécie está o número de acesso no GenBank®: *T. baratai*, (*Tb*), *T. brasiliensis* (*T bras*), *T. costalimai* (*Tc*), *T. garciabesi* (*T gar*), *T. guasayana* (*T. guas*), *T. guazu* (*Tg*), *T. jurbergi* (*Tj*), *T. matogrossensis* (*Tm*), *T. sherlocki* (*T sher*), *T. sordida* (*Ts*), *T. vandae* (*Tv*), *T. williami* (*Tw*) e *Rhodnius neglectus* (*Rn*). Notam-se duas subdivisões dentre as espécies do Centro-Oeste (chaves vermelha e alaranjada). A chave verde indica as espécies encontradas na região Nordeste do país.

5.4.2.2 - Máxima Parcimônia

Essa análise foi realizada com o auxílio do algoritmo MP do programa MEGA 3.1. Nas análises filogenéticas do fragmento 16S, a utilização de *R. neglectus* como grupo externo conferiu um bom suporte às árvores geradas. O grau de confiança da estrutura da árvore está representado pelos valores das ramificações e são suportados por 1.000 replicações (*Bootstrap*) (Fig. 11).

As chaves mostram a proximidade das espécies da região Centro-Oeste, porém com duas subdivisões, que corroboram a distribuição apresentada nos dendogramas relativos ao 16S anteriores, com as chaves vermelha e alaranjada.

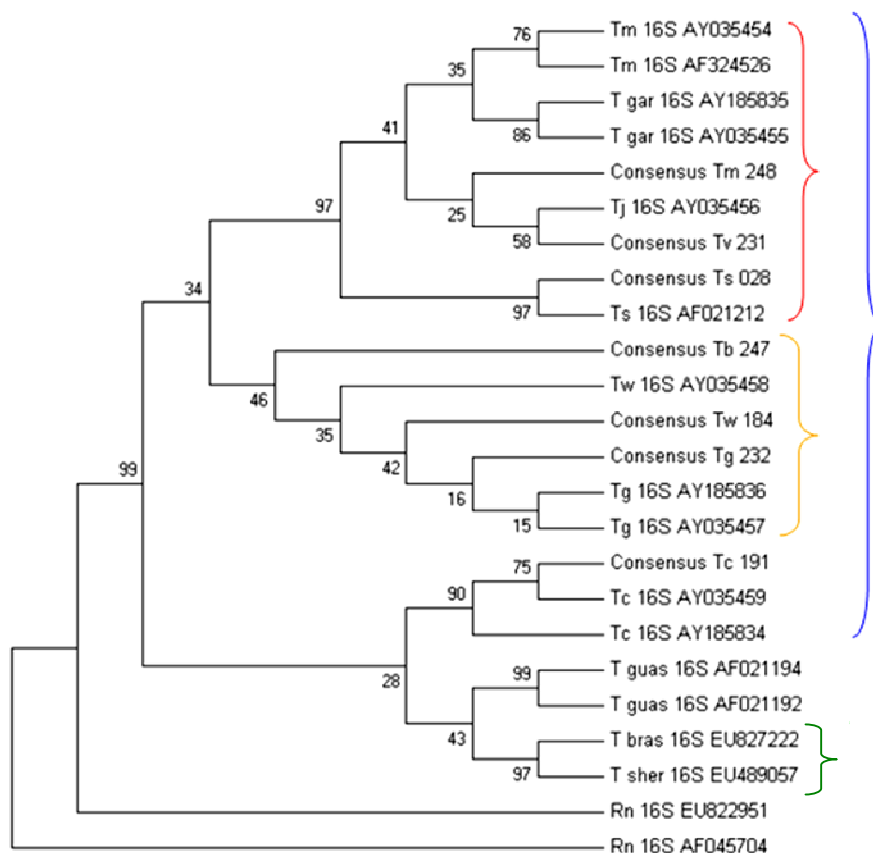


Figura 11: Dendrograma filogenético (MP) baseado na região 16S. Na figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada, ou o número de acesso no GenBank®: *T. baratai* (Tb), *T. brasiliensis* (*T bras*), *T. costalimai* (Tc), *T. garciabesi* (*T gar*), *T. guasayana* (T. guas), *T. guazu* (Tg), *T. jurbergi* (Tj), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sherlocki* (T sher), *T. sordida* (Ts), *T. vandrae* (Tv), *T. williami* (Tw) e *Rhodnius neglectus* (Rn). As espécies da região Centro-Oeste (azul), apresentam duas subdivisões (chaves vermelha e alaranjada). Espécies da região Nordeste (verde).

5.5 – Fragmento Cytb

5.5.1 – Alinhamento

O alinhamento foi realizado em três etapas, por meio do programa ClustalW, e as sequências consensos foram geradas com auxílio do programa BioEdit.

5.5.1.1 – Alinhamento inicial (AI)

Em uma primeira etapa, foram alinhadas as sequências R e F de cada uma das espécies estudadas em triplicata. A partir desse alinhamento foi extraída uma sequência consenso para cada fragmento sequenciado, ou seja, três sequências para cada espécie.

Os fragmentos do gene *Cytb* sequenciados apresentaram entre 360 e 458pb, essa diferença no número de bases sequenciadas deve-se a metodologia aplicada, ou seja, ao sequenciamento direto dos fragmentos. No entanto, não há comprometimento das análises, pois essas sequências apresentaram fragmentos de 401pb (Fig.12).

5.5.1.2 – Alinhamento por espécie (AE)

Em uma segunda etapa foi alinhada a triplicata das sequências AI, das quais se extraiu outra sequência consenso, finalmente gerando apenas uma sequência a partir da triplicata para cada espécie avaliada. A terceira cópia da triplicata de *T. sordida* e a primeira de *T. williamsi* referentes ao fragmento 16S foram perdidas ao longo das análises, no entanto utilizou-se de duas cópias para gerar a sequência relativa a essas espécies.

5.5.1.3 – BLAST

Para avaliar se o fragmento sequenciado realmente foi o esperado, foi utilizada a ferramenta BLAST. Para essas análises foram utilizadas as sequências obtidas para os fragmentos *Cytb* no AE. Essa ferramenta tem o intuito de correlacionar a sequência obtida com as depositadas em bancos de dados. No entanto, essa análise foi comprometida com relação ao fragmento *Cytb*, pois a maioria das espécies avaliadas não apresenta sequências depositadas relativas a esse fragmento.

Dessa forma, as espécies apresentaram baixa correlação, sendo as sequências depositadas, relativas ao fragmento *Cytb*, de *T. rubrovaria*, *T. sherlocki* e de *T. brasiliensis*, as que se mostraram mais próximas às sequências avaliadas.

Apenas a espécie *T. sordida* apresenta sequência do *Cytb* depositada no GenBank® . Dessa forma, a avaliação pelo Blast da sequência de *T. sordida* obtida neste trabalho, mostrou máxima identidade de 92% com uma de *T. sordida* e duas de *T. rubrovaria*, com e-value de $7e-99$ e $1e-96$. A maior similaridade encontrada (99%) foi com *T. rubrovaria*, seguida por *T. sordida* (98%). Esse valor mais baixo de identidade entre as sequências de *T. sordida* reflete o alto grau de polimorfia da sequência avaliada.

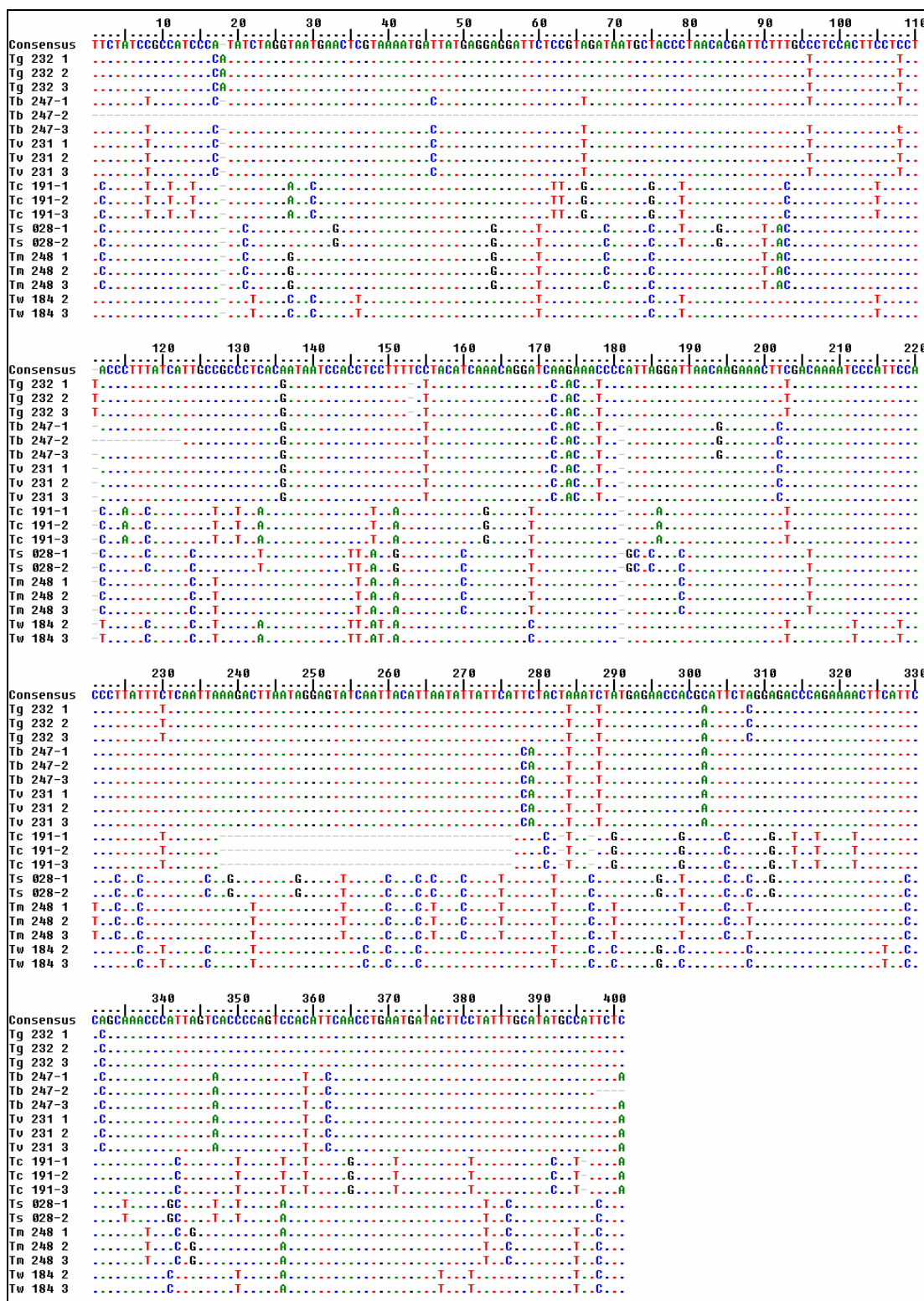


Figura 12: Alinhamento (AI) das sequências do fragmento Cytb (401pb), obtido em análise pelo programa Clustal W. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie, o número da colônia estudada e o número da triplicata: *T. baratai*, (Tb), *T. costalimai* (Tc), *T. guazu* (Tg), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sordida* (Ts), *T. vandae* (Tv), e *T. williami* (Tw).

5.5.1.4 – Alinhamento geral (AG)

Em uma terceira etapa, foram alinhadas as sequências AE do fragmento Cytb, juntamente com sequências de espécies de Triatominae, disponíveis no GenBank® e referentes ao mesmo fragmento (Fig. 13).



Figura 13: Alinhamento (AG) de 316pb das sequências do fragmento Cytb e de sequências disponíveis no GenBank®, conduzido pelo programa Clustal W. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o seu respectivo número de acesso ou o número da colônia estudada: *T. baratai*, (Tb), *T. brasiliensis* (T brasil), *T. costalimai* (Tc), *T. guazu* (Tg), *T. infestans* (T infest), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sherlocki* (T sherlo), *T. sordida* (Ts), *T. vanda* (Tv), *T. williami* (Tw), *Panstrongylus megistus* (P megist) e *Rhodnius neglectus* (Rn).

Nessa etapa alinhou-se um total de 316pb e como grupos externos foram utilizados *P. megistus* e *R. neglectus*, em todas as análises, para enraizar as árvores filogenéticas.

Com o intuito de avaliar as bases polimórficas, gerou-se um mapa de sítios variáveis a partir do alinhamento (AG). Para isso excluíram-se os grupos externos. Com

utilizados dois parâmetros para a construção das matrizes, o Kimura 2 e o MCL, ferramentas disponíveis no programa MEGA 4.

5.5.2.1 – Análise de Distância – Neighbor-Joining

Na Análise de Distância (Neighbor-Joining) foram utilizados dois parâmetros, o Kimura 2 e o MCL, disponíveis no programa Mega (Fig. 14). Os valores de *Bootstrap*, indicados nas ramificações indicam o grau de confiança da estrutura da árvore (porcentagem em 1000 replicações).

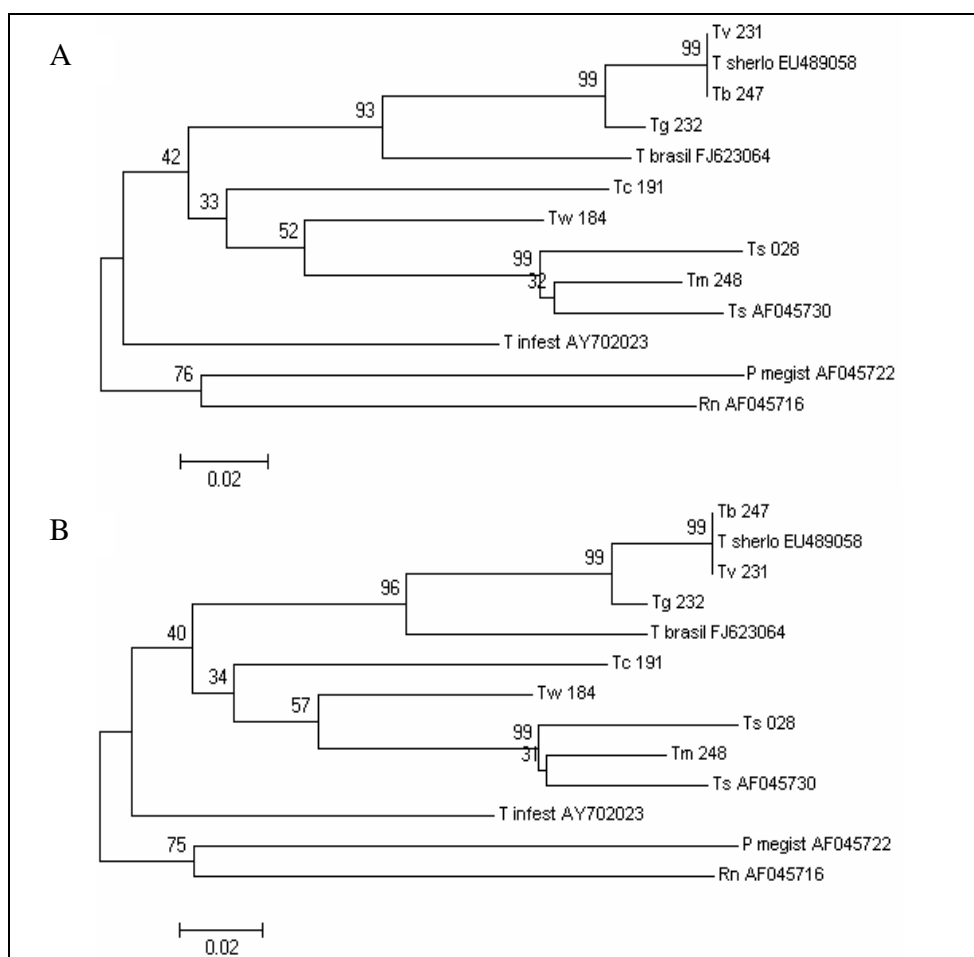


Figura 14: Dendogramas filogenéticos baseados nas sequências da região Cytb do mtDNA utilizando a análise NJ, com o modelo Kimura-2 (A) e com o modelo da MCL (B). O comprimento dos ramos representa a distância genética entre os indivíduos. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada, ou após o nome da espécie está o número de acesso no GenBank®: *T. baratai* (Tb), *T. brasiliensis* (T brasil), *T. costalimai* (Tc), *T. guazu* (Tg), *T. infestans* (T infest), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sherlocki* (T sherlo), *T. sordida* (Ts), *T. vandaie* (Tv), *T. williami* (Tw), *P. megistus* (P. megist) e *Rhodnius neglectus* (Rn).

5.5.2.2 - Máxima Parcimônia

A análise das polimorfias pode ser observada pela árvore filogenética gerada pelo algoritmo MP do programa MEGA 3.1. O grau de confiança da estrutura da árvore está representado pelos valores das ramificações e são suportados por 1.000 replicações (*Bootstrap*). (Fig.15).

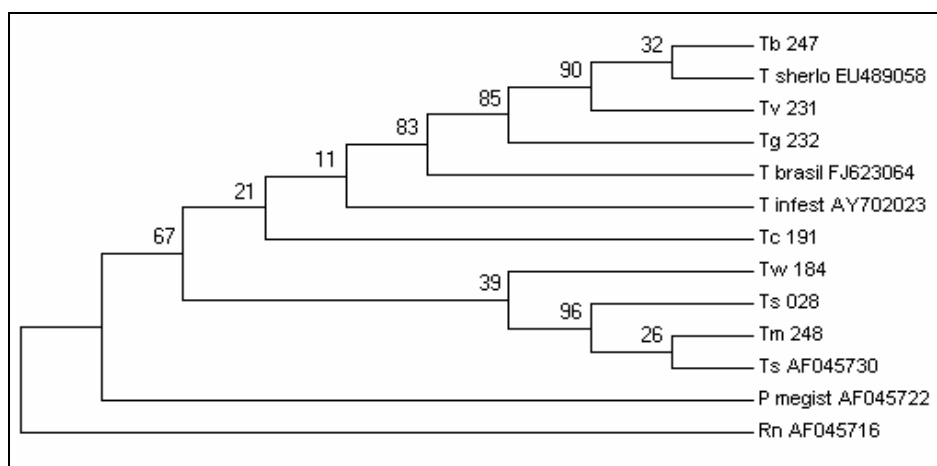


Figura 15: Dendrograma filogenético da região Cytb do mtDNA baseado na análise de MP. Na legenda da figura lê-se o nome da espécie e o número da colônia estudada ou o número de acesso da sequência: *T. baratai* (Tb), *T. brasiliensis* (T brasil), *T. costalimai* (Tc), *T. guazu* (Tg), *T. matogrossensis* (Tm), *T. sherlocki* (T sherlo), *T. sordida* (Ts), *T. vandae* (Tv), *T. williami* (Tw), *P. megistus* (P megist) e *Rhodnius neglectus* (Rn).

Uma metodologia utilizada para avaliar o grau de homoplasia em alinhamento de sequências de nucleotídeos é a construção de um gráfico utilizando o programa DAMBE 5.1.2 (*Data analysis in molecular biology and evolution*) (Xia e Xie, 2001). Dessa forma, foram construídos dois gráficos, um relativo a cada conjunto de sequências alinhadas, ou seja, um para o alinhamento 16S e outro para o Cytb. Foram excluídas dessas análises as sequências relativas aos grupos externos, dos quais se esperava aumentar o grau de polimorfias, ou mesmo homoplasias. Nos gráficos, podemos notar duas linhas, uma azul e uma verde, correspondes a transições (s) e tansversões (v) respectivamente (Fig. 16).

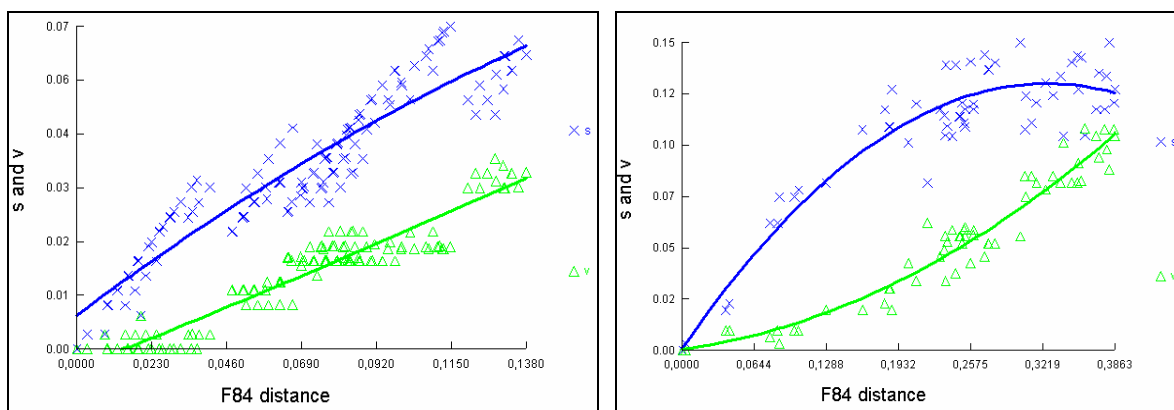


Figura 16: Gráficos gerados pelo programa DAMBE. O gráfico da esquerda representa o alinhamento relativo ao fragmento 16S, e o da direita, ao Cytb. A linha azul corresponde a transições (s) e a verde a transversões (v).

Para demonstrar a distribuição das espécies do subcomplexo *matogrossensis* pela região Centro-Oeste do Brasil, pode-se observar o mapa a seguir (Fig. 17). As marcações no mapa foram feitas com base nas colônias mantidas no Insetário de Triatominae da FCF-Unesp-Araraquara e em vários trabalhos publicados (Lent e Wygodzinsky, 1979; Mello e Borges, 1981; Mello, 1982; Lent et al., 1996; Carcavallo et al., 1998a; Marassá e Barata, 2000; Carcavallo et al., 2002; Noireau et al., 2002; Galvão et al., 2003; Oliveira e Silva, 2007). A distribuição de *T. sordida* foi demonstrada no mapa apresentado por Forattini em 1980 (Fig. 18).

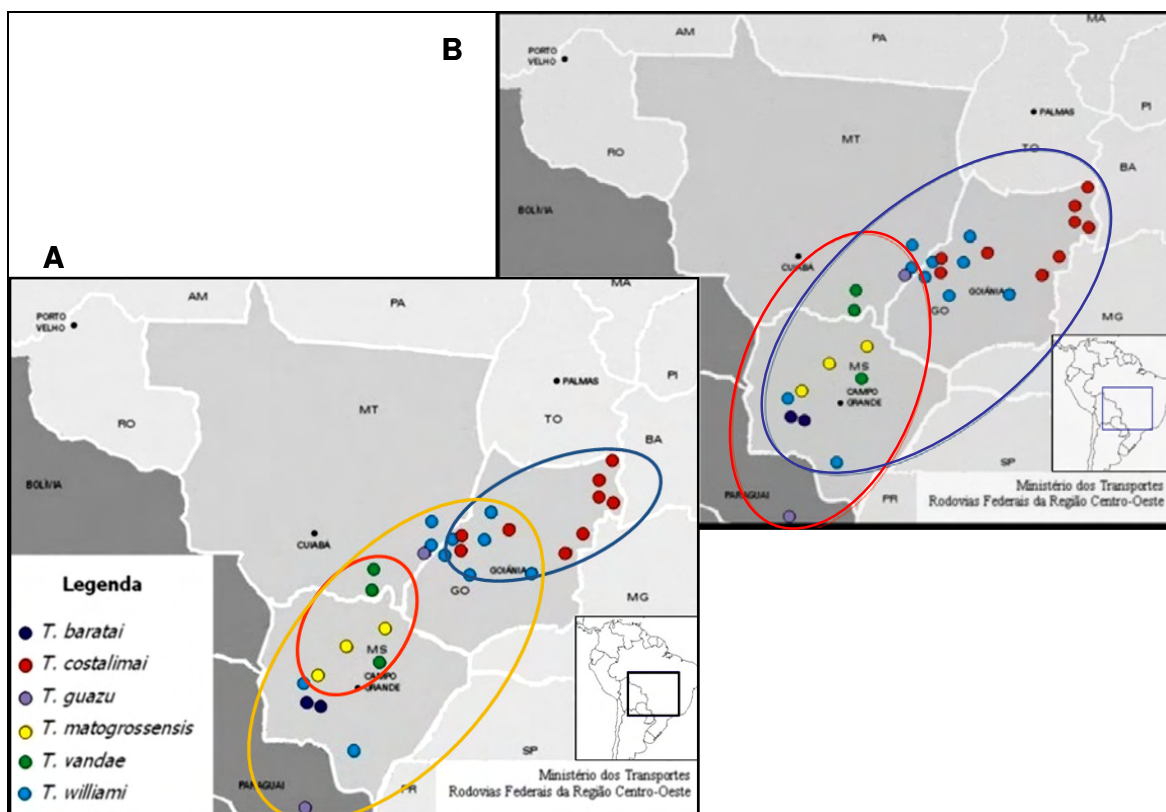


Figura 17: Mapas da região Centro-Oeste do Brasil, com pontuações coloridas, que indicam a distribuição (locais de notificação) das espécies pertencentes ao subcomplexo *matogrossensis* que foram abordadas nesse estudo. Já os círculos apontam os agrupamentos das espécies com base nas relações filogenéticas obtidas respectivamente ao fragmento 16S (A) e Cytb (B).

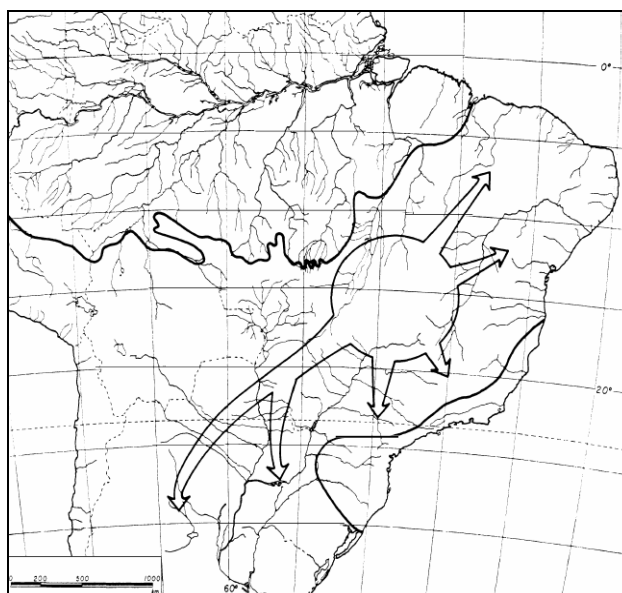


Figura 18: Mapa da América do Sul, com destaque para região de endemismo e dispersão da domiciliação de *T. sordida*, a partir da região Centro-Oeste do Brasil. As linhas escuras marcam os limites de domiciliação dos triatomíneos (Forattini, 1980).

6 - DISCUSSÃO

6.1 – Fragmentos utilizados e análise das sequências

Neste estudo foram utilizados dois genes do genoma mitocondrial, pois além de apresentar uma taxa de evolução maior do que os genes nucleares, os fragmentos avaliados, Cytb e 16S, já dispõe de sequências de Triatominae no GenBank®. Dessa forma, as análises filogenéticas entre espécies simpátricas podem ser facilitadas, pois quanto maior a taxa evolutiva do gene, maior a capacidade de avaliar a divergência de organismos mais próximos (García et al., 2001; Martinez et al., 2006). De acordo com um estudo molecular conduzido por Hypsa et al. (2002), com a avaliação do fragmento 16S, as espécies são claramente posicionadas em três clados, separados também de acordo com as regiões do Brasil. As espécies da região Sul estão no mesmo ramo das do Centro-Oeste, e apresentam as do Nordeste como um ramo basal.

A ferramenta BioEdit é bastante útil, pois apresenta interfaces gráficas para a manipulação das sequências e de outros programas em conjunto, dentre eles o ClustalW. No entanto, é possível que o ClustalW tenha problemas em alinhar grande número de sequências, por rodar em ambiente DOS. Desta forma, os alinhamentos gerados pelo ClustalW podem ainda ser editados pelo BioEdit (Thompson et al., 1994; Matioli, 2001; Schneider, 2007).

Para utilizar o ClustalW, também é necessário conhecer os valores atribuídos para cada penalidade, como criação de deleções e o tamanho dessas, que apresentam como valores padrão de penalização 15 e 6,66 respectivamente. Esses mesmos valores foram utilizados nas análises deste trabalho. Assim, ao diminuir as punições (valores), aumenta-se a permissibilidade de o programa introduzir mais deleções (Thompson et al., 1994, Schneider, 2007).

Com o alinhamento das sequências tanto do fragmento 16S como do Cytb, as regiões polimórficas são facilmente observadas. No entanto, nota-se maior número de polimorfias entre as sequências do Cytb, quando se compara com o alinhamento do fragmento 16S (Fig. 09 e 13). Isso também pode ser observado quando se comparam as porcentagens de sítios polimórficos em relação ao número total de nucleotídeos analisados, 28% para o fragmento 16S e 43% para o Cytb (Tab. 03 e 04)

6.2 - Metodologias de análises filogenéticas

Para o estudo das relações filogenéticas entre espécies de Triatominae, a metodologia mais indicada é o sequenciamento de fragmentos de DNA. No entanto, como toda técnica, também apresenta vantagens e desvantagens (Abad-Franch e Monteiro, 2005).

Como vantagens da utilização de sequências de DNA, cita-se a grande quantidade de sítios informativos, interpretação objetiva, permite estudos de vários níveis taxonômicos dependendo do marcador utilizado. Isso permite a comparação de resultados entre laboratórios a partir de bancos de dados (NCBI) onde são depositadas as sequências de DNA. No entanto, essa é uma técnica que apresenta elevados custos, tanto com relação aos reagentes utilizados quanto aos equipamentos necessários para sua realização, como o termociclador e, principalmente, o sequenciador de DNA. As metodologias empregadas são trabalhosas e dispendem várias horas de atividade e, ao final, obtêm-se informações de um único *locus* (Abad-Franch e Monteiro, 2005).

Com relação às várias metodologias empregadas neste estudo, cada uma apresenta vantagens e desvantagens metodológicas, de acordo com os dados apresentados.

Para avaliar os marcadores moleculares utilizados, é necessário observar que esses apresentam diferentes taxas evolutivas, e podendo cada um ser mais indicado para um determinado problema filogenético. Esses marcadores também podem apresentar transformações laterais, que é a incorporação ou integração de parte do genoma de uma espécie no de outra, como ocorre com algumas espécies de vírus, bem como podem ocorrer grande número de homoplasias, erros ou mutações que podem não ser observados no fragmento sequenciado, esse conceito será discutido com mais detalhes adiante (Nei, 1996; Mاتيoli, 2001).

A filogenia molecular tem por objetivo determinar a história evolutiva do gene em questão e estimar o tempo de divergência entre dois organismos e o último ancestral compartilhado. A árvore filogenética (dendograma) é a representação gráfica da história evolutiva dos organismos nela representados, o que facilita a interpretação das regiões polimórficas e a visualização dos táxons mais aproximados. As árvores filogenéticas podem ser formadas com base na distância genética ou nos caracteres polimórficos dos organismos estudados (Pinteiro et al., 2005).

Para a construção dos dendogramas foi utilizado o programa de análise filogenética MEGA 4.0. Dessa forma, foram utilizadas as sequências do AG geradas pelo

BioEdit e estão identificadas nos dendogramas como consensus, ou apenas a abreviatura da espécie e número da colônia (Fig. 09 e 13). As relações filogenéticas foram traçadas utilizando-se os parâmetros analíticos de máxima parcimônia e de distância genética.

Para as análises de distância foi utilizado o algoritmo NJ, uma metodologia bastante simples, que gera dendogramas com base na distância genética dos organismos estudados e se baseia em calcular par-a-par a distância genética entre as sequências, e, com base nisso, construir a topologia (Pinteiro et al., 2005). Esse método despende pouco tempo de análise e pode ser aplicada a bases de dados bastante extensas. No entanto, utiliza-se de matrizes para gerar o dendograma, assim, não considera os dados originais, e sim as distâncias entre eles.

As análises de distância são realizadas com base em uma matriz de dados, que pode ser gerada a partir de vários parâmetros. Dessa forma, foram utilizados dois métodos para gerar a matriz de distância genética necessária para a construção do dendograma. O primeiro método a ser utilizado foi o algoritmo Kimura de dois parâmetros (Kimura 2), que considera as mutações do tipo transições (purina-purina ou pirimidina-pirimidina) mais prováveis de ocorrer do que as transversões (purina-pirimidina ou pirimidina-purina). O outro método utilizado foi o algoritmo da MCL, que tem como objetivo inferir dendogramas que demonstrem a história evolutiva mais consistente em relação aos dados apresentados, assim, esta metodologia gera dados que indicam a maior probabilidade dos dados observados realmente terem ocorrido (Kimura, 1980; Pinteiro et al., 2005) (Fig. 14).

Vale salientar que as análises geradas pelo algoritmo NJ indicam a distância genética ou porcentagem de divergência genética entre um grupo e seu ancestral comum. Assim, o comprimento da linha horizontal indica a divergência entre os extremos. Desta forma, a barra indicada abaixo dos dendogramas de distância indica a porcentagem de divergência relativa ao comprimento dessa barra. Essa linha relaciona-se a barra indicada abaixo dos dendogramas, nesse caso, a cada distância relativa a barra considera-se 0,02% de divergência entre o táxon e seu ancestral (Saitou e Nei, 1987; Kumar et al., 2008).

Já, as análises de parcimônia, avaliam cada sítio polimórfico diretamente das sequências, e considera o menor número de passos para se obter o caráter observado. É um método de premissas simples e que exige grande esforço computacional, pois não há necessidade da construção de uma matriz de dados para construir o dendograma filogenético, como nas análises de distância (Fitch, 1970; Felsenstein, 1978; Bos e Posada,

2005). Essa metodologia considera o menor número de mudanças necessárias para explicar os dados apresentados, dessa forma, seu algoritmo pode gerar algumas imperfeições nas análises (Kumar et al., 2008). Mas, será que a natureza é realmente parcimoniosa?

Algumas vezes nota-se que a “lei do menor esforço” não se aplica, como no caso das homoplasias, que atrapalham bastante esse tipo de análise, o que pode gerar resultados errados, se os casos de homoplasia forem comuns ou concentrados em partes específicas das sequências ou da árvore. As homoplasias ou substituições múltiplas representam erros ou mutações que ocorreram e não podem ser observadas no genoma (Bos e Posada, 2005).

Por exemplo, se temos uma base C em determinado sítio e em outra sequência, em local homólogo temos um G, temos uma mutação de C para G (C-G), com apenas um passo ou um evento ocorrido. No entanto, podem ter ocorrido eventos que não são demonstrados, como por exemplo, essa mesma base C pode ter mudado para uma base A e novamente para uma base G, esse evento caracteriza uma homoplasia (C-A-G), com dois eventos de mutação. Assim, a análise de MP consideraria apenas a primeira opção. No entanto, esse tipo de análise pode ser bastante confiável se homoplasias e substituições múltiplas forem raras ou distribuídas aleatoriamente na topologia (Bos e Posada, 2005).

Dessa forma, foi notório o maior grau de polimorfias para o fragmento Cytb em relação ao 16S, o que tende a um número elevado de homoplasias. Assim, o grau de homoplasia do alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento 16S e Cytb foram avaliados graficamente (Fig. 16) (Xia e Xie, 2001).

Na figura 16, em cada um dos gráficos, notam-se duas linhas, uma azul e outra verde. A linha azul corresponde a transições (s) e a verde a transversões (v). As transições são mutações que alteram ou trocam bases do tipo purina (G e T) por outra purina, ou uma pirimidina (C e A) por outra pirimidina. Já as transversões são mutações que alteram purinas por pirimidinas ou vice-versa. O algoritmo F84 calcula a distância entre transversões e transições das sequências e de um outro gene, que é padrão para cada algoritmo do programa (Xia e Xie, 2001; Schneider, 2007). No gráfico referente ao fragmento 16S, ambas as retas são ascendentes e não apresentam evidência de estabilização, ou seja, não sugerem saturação, o que demonstra bom sinal filogenético e baixa taxa de homoplasias. Já o gráfico da direita, relativo ao fragmento Cytb, assemelha-se com primeiro, exceto pelo fato de que a curva das transições (azul) atingiu o ponto de saturação e começa a descender. Isso indica

a existência de um considerável grau de homoplasia, porém o sinal filogenético ainda é considerável, pois as curvas não se cruzam.

No caso de um elevado grau de homoplasias, então, poder-se-ia excluir das análises as regiões homoplásicas. No entanto, as homoplasias relativas ao fragmento Cytb estão dispersas por toda a sequência, o que torna impossível a exclusão desses sítios. Dessa forma, as análises geradas pelas sequências correspondentes a esse fragmento foram comprometidas, pois os dados apresentam um comprometimento do sinal filogenético. Se por acaso as retas chegassem a se cruzarem, haveria um indício de saturação dos dados em razão da magnitude das divergências entre as sequências, o que prejudicaria muito o sinal genético, e isso, impossibilitaria as análises (Xia e Xie, 2001; Schneider, 2007).

Ao observar a distribuição das espécies nos dois dendogramas de distância genética para o fragmento 16S (Fig. 10), nota-se que não houve alterações significativas entre as mesmas. Nota-se que ambos apresentam praticamente o mesmo formato, número de ramos, distribuição dos clados, e os valores de *Bootstrap*, que também pode ser observado para o fragmento Cytb.

De acordo com os resultados encontrados nas análises dos fragmento 16S e Cytb, a espécie *T. costalimai* mostrou-se a mais distante dentre as demais espécies da região Centro-Oeste. Essa espécie apresentou maior proximidade genética com as da região Nordeste do Brasil: *T. brasiliensis* e *T. sherlocki* (Fig. 10 e 11).

Pela análise do fragmento 16S, é notória a distinção de três clados (Fig. 10 e 11). Os dois primeiros englobam espécies da região Centro-Oeste, o primeiro é composto pelas espécies *T. matogrossensis* bastante próximas e diretamente relacionadas com *T. jurbergi* e *T. vandae* e, externo a essas, *T. garciabesi* e *T. sordida*. O segundo grupo compreende *T. baratai*, muito próximo a *T. williami*, que é fortemente relacionado com *T. guazu*. O terceiro clado é composto pelas espécies por *T. guasayana*, que forma um grupo irmão com as espécies da região nordeste do Brasil, *T. brasiliensis*, *T. sherlocki*. A espécie *T. costalimai* posiciona-se em um ramo basal com relação ao clado formado pelos três grupos citados acima.

Nas análises do fragmento 16S, as espécies da Região Centro-Oeste, apesar de bastante próximas, distribuíram-se em dois grupos, semelhante ao observado nas análises de distância genética: o primeiro grupo composto pelas espécies *T. garciabesi*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. sordida* e *T. vandae*. O segundo grupo compreende *T. baratai*, *T.*

williami e *T. guazu*. Além da presença desses dois grupos, nota-se a disposição de *T. sordida* e *T. garciabesi*, pertencentes ao subcomplexo *sordida*, em meio às espécies do subcomplexo *matogrossensis* (Fig.10 e 11).

De acordo, com as análises do fragmento Cytb, *T. costalimai* constituiu um ramo basal com o clado que agrupa *T. sordida*, *T. matogrossensis* e *T. williami*, esse último constituindo um clado independente entre os demais, o que demonstra uma divergência recente (Fig. 14). O outro clado mostra *T. brasiliensis*, que forma um ramo basal e se distingue do agrupamento composto por *T. vandae*, *T. sherlocki*, *T. baratai*, com *T. guazu*, formando um clado independente (Fig. 14). A árvore mais parcimoniosa gerada apresentou basicamente a mesma distribuição dos dendogramas de distância. Com *T. baratai*, *T. sherlocki*, *T. vandae* e *T. guazu* unidos em um clado, e com *T. williami*, *T. sordida* e *T. matogrossensis*, em outro clado. No entanto, *T. infestans* apresentou-se em meio à sequências, próximo a *T. brasiliensis* (Fig. 15).

A formação desses dois grupos que dividem as espécies pertencentes ao subcomplexo *matogrossensis* também foi observada em outros estudos. Hypsa et al. (2002) e Sainz et al. (2004) avaliaram essas espécies com base no sequenciamento do fragmento 16S. Noireau et al. (2002) encontraram essa mesma divisão com análises isoenzimáticas das espécies desse subcomplexo. Esse último foi o único trabalho a apresentar um posicionamento filogenético para *T. vandae* (Anexo).

Além da presença de dois grupos em meio às espécies do Centro-Oeste, a análise dos fragmentos 16S e Cytb aproximaram *T. sordida* e *T. matogrossensis* e apontam *T. sordida* e *T. garciabesi* em meio às espécies do subcomplexo *matogrossensis* (Figs.10 e 11 e Anexo).

Alguns autores já relataram a aproximação genética entre *T. sordida* e *T. matogrossensis*, ao analisarem dados moleculares (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004). Essa similaridade genética vem confirmar a análise combinatória dos genes 16S e 12S elaborada por García, et al. (2001), que mostrou *T. sordida*, originário da Argentina, estar relacionado fortemente à *T. sordida* e *T. matogrossensis* coletados no Brasil.

Essas duas espécies são bem distintas morfológicamente e, apesar das semelhanças genéticas, são também distantes cladisticamente, pertencendo cada uma, a um complexo diferente (García, et al., 2001; Shofield e Galvão, 2009). Desta forma, ao observar a sua distribuição, pode-se entender com mais clareza a proximidade genética

entre *T. sordida* e as demais espécies dispersas pelo Centro-Oeste (Forattini, 1980) (Fig. 18).

Podemos observar vários sítios polimórficos entre a sequência do fragmento Cytb de *T. sordida*, obtida neste trabalho, e a sequência disponibilizada no GenBank® (Fig. 12 e Tab. 04). Essa constatação deve-se provavelmente ao grande número de sítios polimórficos do fragmento avaliado, no entanto, essa espécie foi a única que apresentou sequência no GenBank® para comparação. Dessa forma, não temos o mesmo parâmetro com relação às outras espécies, para uma avaliação mais detalhada. A presença de sítios polimórficos entre essas sequências justifica-se também pela grande dispersão de *T. sordida*. A sequência relativa ao fragmento Cytb depositada refere-se a um exemplar oriundo de Cochabamba, na Bolívia e o exemplar avaliado neste trabalho origina-se de Brasilândia, no Mato Grosso do Sul (Lyman et al., 1999). Assim, quanto maior a distância geográfica, também se espera maior variação entre as sequências apresentadas (Matioli, 2001).

6.3 - Distribuição geográfica das espécies

A distribuição das espécies do subcomplexo *sordida*, *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T. sordida*, indicam a parafilia do grupo, pois, suas espécies se dividem em dois clados: *T. guasayana* em um clado junto às espécies da região Nordeste, e *T. garciabesi* e *T. sordida* juntas às espécies do Centro-Oeste. As espécies que compõem o subcomplexo *matogrossensis* também demonstram indícios de parafilia, pois suas espécies dividem-se em dois grupos e, ainda, externo a esses temos *T. costalimai* (Fig. 10 e 11).

Alguns estudos relacionam *T. guasayana* a *T. circumaculata*, formando um grupo irmão de *T. rubrovaria* e *T. klugi*, espécies pertencentes ao subcomplexo *rubrovaria*, que compreende espécies da região Sul do Brasil e países próximos. Além disso, todas essas espécies juntam-se em um clado com *T. patagonica*, também pertencente ao subcomplexo *sordida* (Hypsa et al., 2002; Sainz et al., 2004; Schofield e Galvão, 2009).

Algumas das sequências obtidas para o fragmento 16S foram idênticas as que estavam disponíveis no banco de dados, como é o caso de *T. costalimai* e *T. guazu*. Isso pode ter ocorrido por tratar-se de exemplares de regiões muito próximas, mesmo porque *T. costalimai* e *T. guazu* apresentam distribuição pouco ampla (Fig. 17) (Sainz et al., 2004).

As três sequências relativas ao fragmento 16S da espécie *T. guazu* formaram um ramo com divergência nula, bem como as duas sequências de *T. sordida*, o que indica que essas espécies não apresentam variação genética entre si, para os exemplares avaliados (Fig. 10). No caso de *T. guazu*, isso ocorre porque sua distribuição geográfica é bastante restrita (Fig. 17). Já no caso de *T. sordida*, apesar de sua ampla distribuição geográfica, os exemplares avaliados pertencem a regiões próximas (Tab. 02) (García e Powell, 1998; Sainz et al., 2002).

Contudo, baseando-se nas análises moleculares podemos confirmar algumas similaridades morfológicas. Por exemplo, *T. baratai* assemelha-se bastante a *T. williami*, e essa proximidade morfológica evidenciou-se também durante as análises moleculares do fragmento 16S (Figs. 10 e 11).

A mesma relação pode ser observada entre as espécies *T. vandae* e *T. jurbergi* (Figs. 10 e 11). No entanto, *T. vandae* apresenta semelhanças cromáticas com *T. baratai*, o que é observado nas análises do fragmento Cytb (Figs. 14 e 15).

Dentre as espécies do Centro-Oeste avaliadas neste trabalho, as de coloração mais escura, *T. baratai*, *T. guazu* e *T. williami*, apresentaram-se em um clado de acordo com a avaliação do fragmento 16S, mas apenas *T. baratai* e *T. guazu* apresentaram-se próximas com relação ao fragmento Cytb. Já as espécies de coloração mais clara *T. vandae*, *T. sordida* e *T. matogrossensis*, foram agrupadas pelo 16S, e com relação ao Cytb, apenas *T. matogrossensis* e *T. sordida*, permaneceram unidas (Fig. 10 e 14).

Avaliando-se o fragmento 16S, observamos *T. vandae* junto a *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, o que corrobora com a análise conduzida por Noireau et al. (2002). Também se observa *T. baratai* junto a *T. williami* e *T. guazu* (Fig. 10 e 11). Assim, as primeiras análises filogenéticas, por meio de sequenciamento de DNA (16S), das espécies *T. baratai* e *T. vandae*, as relacionam fortemente as espécies do subcomplexo *matogrossensis* encontradas no Centro-Oeste do Brasil.

Dessa forma, de acordo com as análises realizadas, justifica-se o agrupamento dessas duas espécies junto a esse subcomplexo, porém cada uma posicionada em um dos dois grupos já definidos (Fig. 10 e 11).

Assim, com relação aos processos evolutivos e dispersivos, as análises filogenéticas relativas ao fragmento 16S relacionaram as espécies avaliadas com maior coerência, quando comparados com os resultados obtidos pelo fragmento Cytb.

7 - CONCLUSÕES

Triatoma baratai e *T. vanda* foram incluídas junto às espécies do subcomplexo *matogrossensis* encontradas no Centro-Oeste do Brasil, com base em análises de sequências de DNA.

Dentre as sete espécies da região Centro-Oeste do Brasil estudadas, *T. costalimai* mostrou-se a mais afastada entre todas e apresentou-se mais próxima de *T. brasiliensis* e *T. sherlocki*, que ocorrem na região Nordeste.

Por meio do sequenciamento do citocromo b e do 16S, *T. sordida* e *T. matogrossensis* mostram-se próximas geneticamente, bem como *T. baratai* e *T. guazu*.

Os marcadores utilizados mostraram que *T. sordida*, do subcomplexo *sordida*, apresenta-se junto às espécies do subcomplexo *matogrossensis*.

O fragmento citocromo b apresentou alto grau de polimorfias e homoplasias ao longo das sequências, dessa forma, a análise do fragmento 16S apresentou maior clareza na interpretação dos dados, com relação aos aspectos morfológicos e biogeográficos.

As análises filogenéticas relativas ao fragmento 16S relacionaram as espécies avaliadas com maior coerência, do que as análises do fragmento Cytb.

Observou-se agrupamento das sete espécies da região Centro-Oeste estudadas, porém distribuídas em dois grupos, o que indica parafilia desse subcomplexo.

De acordo com o fragmento 16S:

As sete espécies estudadas distribuíram-se em um grupo formado por *T. matogrossensis*, *T. sordida* e *T. vanda*, e outro por *T. baratai*, *T. guazu* e *T. williami*, com *T. costalimai* formando um ramo à parte das demais.

Triatoma baratai e *T. vanda*, posicionaram-se separadamente, cada uma em um dos subgrupos indicados para o subcomplexo *matogrossensis*.

De acordo com o fragmento Cytb:

As espécies avaliadas apresentaram-se em um clado composto por *T. costalimai*, *T. sordida*, *T. matogrossensis* e *T. williami*, e outro por *T. vanda*, *T. baratai* e *T. guazu*.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3 p. 437-454, 2005.
- ABALOS, J. W.; WYGODZINSKY, P. **Las Triatominae argentinas (Reduviidae, Hemiptera)**. Instituto Medicina Regional de Tucumán. (monografía n. 2), Argentina. n. 601, 179pp, 1951.
- ACTIS, A. S.; TRAVERSA, O. C.; CARCAVALLO, R. U. Estudios taxonómicos sobre el género *Triatoma* Laporte mediante la electrophoresis de la linfa. **An. Esc. Nac. Ciências Biol.**, v. 13. p. 97-106, 1964.
- ALMEIDA, C. Reforma de sistemas de servicios de salud y equidad em América latina y el Caribe: algunas lecciones de los años 80 y 90. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 905-925, 2002.
- ALMEIDA, P. S. et al. Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 374-380, 2008.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev Patol Trop**, v.3, p.65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v.18 (Suppl), p.39-46, 1985.
- ANDRADE, S. G., MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v.31, p.27-35, 1997.
- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R., COSTA, J. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora Ltda., Rio de Janeiro, 63 pp, 2008.
- BOS, D. H.; POSADA, D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 211–227, 2005.

BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease. **Parasitology Today** 2, London: Elsevier Science, p.196-197, 1986.

BRISSE, S.; BERNABÉ, C., TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.35-44, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineales. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1218-1226, 2001.

BROWN, J. K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-*Begomovirus* complexes. **Virus Research.**, v.71, p.233-260, 2000.

CARCAVALLO, R. U.; MARTÍNEZ, A. M. Biología, ecología y distribución geográfica de los Triatomíneos Americanos (excepto *R. prolixus*, *P. megistus*, *T. dimidiata* y *T. infestans*). In: CARCAVALLO, R. U.; RABINOVICH, J. E.; TONN, R. J. **Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud., v.1, p.149-208, 1985.

CARCAVALLO, R. U.; CANALE, D. M., MARTÍNEZ, A. Habitats de triatomíneos argentinos y zonas ecológicas donde prevalecen. **Chagas**, v.5, n.1, p. 8-17, 1988.

CARCAVALLO, R. U.; GALVÃO, C., LENT, H. *T. jurbergi* sp.n. do norte do Estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) com uma atualização das sinónimas e outros táxons. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.459-464, 1998a.

CARCAVALLO, R. U. et al. Habitats and related fauna. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. (eds.), **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. v.2, p.561-600, 1998b.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the Triatominae. A General approach. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, v.3, p.925-969, 1999.

CARCAVALLO, R. U., JURBERG, J. *T. baratai* sp.n. do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomologia y Vectores**, v.7, p.373-387, 2000.

CARCAVALLO, R. U. et al. Nova espécie do complexo *oliveirai* (nova denominação para o complexo *matogrossensis*) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.1, p.71-79, 2001.

CARCAVALLO, R. U. et al. *Triatoma vandae* n. sp. do complexo *oliveirai* encontrada no Estado de Mato Grosso, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.649-654, 2002.

CERETTI-JUNIOR, W. et al. Taxonomic and systematic analysis among triatomine species (Hemiptera: Reduviidae) of colonies from SESA (Special Health Service of Araraquara), inferred from 16S mitochondrial DNA sequences. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.52, n.3, p.455-462, 2008.

CHAGAS, C. J. R. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, n. 2, p.159-218, 1909.

CHIEFFI, P.P., AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Medicina** (São Paulo), v. 79, n. 1, p. 12-26, 2000.

COSTA, J. et al. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 92, n.4, p.459-464, 1997.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; GIORDANO, C. M., FUNATSU, I. R. K. Chagas' disease in the brazilian. I—A short review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.36, n.4, p.363-368, 1994.

COURA, J. R., CANÇADO, J. R. A história da terapêutica da doença de Chagas. Ministério da Saúde – Fiocruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>
Acesso em: 25/07/2009.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L. ; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 513-515, 1984.

DIAS, J. C. P. Aspectos políticos em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.28, n.3, p.41-45, 1995.

DIAS, J. C. P. O sinal de Romana e a doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 407-413, 1997.

DIAS, J. C. P., SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.4, 1998.

DIAS, J. C.; PRATA, A., SCHOFIELD, C, J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.669-678, 2002.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.1, 2007.

DIOTAIUTI, L.; PAULA, O. R.; FALCÃO, P. L.; DIAS, J. C. P. Avaliação do programa de controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referência especial ao *Triatoma sordida*. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 118, n. 3, 1995.

DIOTAIUTI L. O risco de domiciliação de novas espécies de triatomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.2, p.31-35, 2000.

DUJARDIN, J. P. et al. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. **Journal of Medical Entomology**, v.24, n.1, p.40-5, 1987.

DUJARDIN, J. P., SCHOFIELD, C. J. PANZERA, F. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. Recherches Taxonomiques, Biologiques et Génétiques, Academie Royale des Sciences d'Outre Mer, Brussels. **Classe des Sciences Naturelles et Médicales**. v. 24, n. 5, p. 162, 2000.

FELSENSTEIN, J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. **Systematic Zoology**, v. 27, n. 4, p. 401-410, 1978.

FITCH, W. M. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. **Systematic Zoology**, v. 20, p. 406-16, 1970.

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.14, n.3, 1980.

GALINDEZ-GIRÓN, I. et al. Estudio morfológico de *Triatoma guazu* Lent, Wygodzinsky, 1979 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.4, p.539-543, 1997.

GALVÃO, A. B.; SOUZA, H. A. S., LIMA, R. R. *T. williami* n.sp. (Hemiptera: Triatominae). **Revista Brasileira de Malacologia e Doenças Tropicais**, v.17, p.363-366, 1965.

GALVÃO, A. B.; SOUZA, H. A., LIMA, R. R. Espécies de Triatominae ocorrentes em Goiás e descrição de uma nova espécie. **Revista Brasileira de Malacologia e Doenças Tropicais**, v.19, p.397-412, 1967.

GALVÃO, C. et al. Distribuição Geográfica e Dispersão Alti-latitudinal de Alguns Gêneros e Espécies da Tribo Triatomini Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.1, p.33-37, 1998.

GALVÃO, C.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J., CARCAVALLO, R. U. Ampliação da distribuição geográfica de *Triatoma deaneorum* Galvão, Souza, Lima 1967, nova denominação para *Triatoma deanei* (Hemiptera, Reduviidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.6, p.587-589, 2001.

GALVÃO, C. A sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. **Entomologia y Vectores**, v.10, n.4, p.511-530, 2003.

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

GALVÃO, C., ANGULO, V. M. *Belminus corredori*, a new specie of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) form Santander, Colômbia. **Zootaxa**, v.1241, p.61-68, 2006.

GARCÍA, B. A.; BARATA, J. M. S, BLANCO, A. Enzyme polymorphism among *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) colonies. **Journal of Medical Entomology**, v.32, p.126-133, 1995a.

GARCÍA, B. A.; CANALE, D. M., BLANCO, A. Genetic structure of four species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v.32, p.134-137, 1995b.

GARCÍA B. A.; POWELL J. R.; Phylogeny of Species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Journal of Medical Entomology**. v.35, n.3 p.232 – 238, 1998.

GARCÍA, B. A.; MORIYAMA, E. N., POWELL, J. R. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. **Entomological Society of América**, v.38, n.5, p.675-683, 2001.

GIORDANO, R.; CORTEZ, J. C. P.; PAULK, S.; STEVENS, L. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, v.100, n.7, p. 753-760, 2005.

GOMES, M. L. *Trypanosoma cruzi*: otimização da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da doença de Chagas crônica e caracterização molecular de cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos no noroeste do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.323-324, 1998.

GORLA, D. E.; DUJARDIN, J. P., SHOFIELD, C. J., Biosystematics of Old World Triatominae. **Acta Tropica**, v.63, p.127-140, 1997.

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

HARRY, N.; ROBIN, S., LACHAISE, D. L'utilisation de marqueurs génétiques polymorphes (RAPDs) en entomologie évolutive et appliqué. **Annales de la Société Entomologique de France**, v.34, p.9-32, 1998.

HARRY et al. New perspectives for population genetics of Chagas'disease vectors in the Northeastern Brazil: isolation of polymorphic microsatellite markers in *Triatoma brasiliensis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9 n.4, p.633-637, 2009.

HERWALDT, B. L.. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14: p.659-688, 2001.

HUELSENBECK, J. P.; HILLIS, D. M. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. **Systematic Biology**, v. 42, p. 247–64, 1993.

HYPSON, V. et al. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.23, p.447-457, 2002.

ISAC, E.; ALVES, R. B. N.; ROCHA, A. P.; COSTA JUNIOR, O. O., SANTOS, A. H. Biologia do *Triatoma costalimai* (Verano, Galvão, 1959) (Hemiptera, Reduviidae). **Revista de Patologia Tropical**, v.29, n.2, p.233-40, 2000.

JURBERG, J.; LENT, H.; GALVÃO, C. Male genitalia and its importance in taxonomy. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. (eds.). **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Fiocruz, Rio de Janeiro, v.1, p.85-106, 1997.

JURBERG, J. et al. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martinez, Prosen, Ronderos, 1967 (HEMIPTERA-REDUVIIDAE). **Entomologia y Vectores**, v.5, n.3, p.107-122, 1998.

JURBERG, J. Ferramentas Usadas em Taxonomia de Triatomíneos o uso Múltiplo. **Entomologia y Vectores**, v.10 n.4, p.497-509, 2003.

JURBERG, J. et al. Uma iconografia dos triatomíneos (HEMIPTERA: REDUVIIDAE). **Entomologia y Vectores**, v.11, n.3, p.457-494, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-20, 1980.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**. v. 17, n. 12, p. 1244-5, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K., NEI, M. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2005.

KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, p. 299-306, 2008.

LEITE, I. C., BARBOSA, A. *Triatoma (Eutriatoma) matogrossensis* n. sp. **Boletim do Instituto Oswaldo Cruz**, v.2, n.9, p.1-4, 1953.

LEITE, G. R. Guia de Identificação dos triatomíneos do Espírito Santo. 2008. Versão Beta 1. Disponível em: <http://www.geocities.com/gugarl1980/triatominaes.html>. Acesso em: 15/07/2009.

LENT, H.; JURBERG, J. Algumas informações sobre *Triatoma spinolai* Porter, 1934, com um estudo sobre as genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira Biologia**, v.27, p.273-288, 1967.

LENT, H.; JURBERG, J. Estudo morfológico comparativo de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, v.28, p.499-520, 1968.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, v.29, p.487-560, 1969.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Panstrongylus* Berg, 1879, com um estudo sobre a genitália externa das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, v.35, p.379-438, 1975.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.163, n.3, p.123-520, 1979.

LENT, H.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. Descrição do alótipo (macho) de *Triatoma guazu* Lent, Wygodzinsky, 1979 proveniente do Estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p.313-315. 1996.

LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). **Jornal da Unicamp**, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 11 a 17 de abril de 2005. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju283pag02.pdf. Acesso em: 4/09/2007.

LEWIS, M. D. et al. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n. 6, p. 1041-1049, 2009.

LOROSA, E. S.; et al. Estudo da infecção natural e fontes alimentares de *Triatoma costalimai* Verano, Galvão, 1959, *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 e *Psammolestes tertius* Lent, Jurberg, 1965 do Estado de Goiás, Brasil, através da técnica de precipitina. **Entomologia y Vectores**, v.6, p.405-414. 1999.

LUKASHEVICH, E. D., MOSTOVSKI, M. B. Hematophagous insects in the fossil record. **Journal of Paleontology**, v.37, p.153-161, 2003.

LYMAN, D. F.; MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D. M.; DUJARDIN, J. P., BEARD, C. B. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatomine vectors of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, p.377-386, 1999.

MARASSÁ, A. M., BARATA, J. M. S. Nota sobre tipos e espécimes de triatomíneos depositados na Coleção Entomológica do Instituto Butantan, São Paulo (Hemiptera:Reduviidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.33, n. 2, p. 227-230, 2000.

MARCILLA, A. et al. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera-Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.18, n.1, p.136-142, 2001.

MARCILLI, A. et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.615–623, 2009.

MARTÍNEZ, F. H. et al. Taxonomic study of the *phyllosoma* complex and other triatomíneo (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.41, p.279–287, 2006.

MARTINS, L. P. A.; CASTANHO, R. E. P.; ROSA, J. A.; SILVA, L. C.; GODOY, C. A. P., ROSA, R. M. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.35-39, 2003.

MASSARO, D. C.; REZENDE, D. S., CAMARGO, L. M. A. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v.1, n.2, p.228-40, 2008.

MATIOLI, S.R. Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MELLO, D. A., BORGES, M. M. Primeiro encontro do *Triatoma costalimai* naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo de aspectos biológicos da amostra isolada. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.76, n.1, p.61-9, 1981.

MELLO, D. A. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista Saúde Pública**, v.16, p.282-91, 1982.

MENDONÇA, V. J. et al. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n.5, p.858-864, 2009.

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

MOTT, K. E.; HAGSTROM, J. W. C. The Pathologic Lesions of the Cardiac Autonomic Nervous System in Chronic Chagas' Myocarditis *Circulation*, v.31, p.273-286 **Circulation**, 1965

MS - Ministério da Saúde- **Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN**. 2004. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_chagas.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2007.

MS – Ministério da Saúde. Nota técnica – **Doença de Chagas Aguda. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf>. Acesso em: 19 jun.2008.

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

MS – Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. Doença de Chagas – **Descrição da Doença**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?indtxt=27874>. Acesso em: 06 jun. 2009.

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

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 02/07/2009

NEI, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 3, p. 371–403, 1996.

NEIVA, A.; PINTO, C.; LENT, H. Notas sobre triatomíneos do Rio Grande do Sul e descrição de uma nova espécie. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.34, p.607-610, 1939.

NEIVA, A.; LENT, H. Triatomídeos do Chile. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.39, n.1, 1943.

NOIREAU, F.; SANTOS, S. M.; GUMIEL, M.; DUJARDIN, J. P.; SOARES, M. S.; CARCAVALLO, R. U.; GALVÃO, C., JURBERG, J. Phylogenetic relationships within the *oliveirai* complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Infection Genetics and Evolution** v.2, p.1-17, 2002.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P., JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v.40, n.2, p.26, 2009.

O CASO da Doença de Chagas. Como o discutiui a Academia de Medicina. **O Jornal**, Rio de Janeiro: 23 nov. 1923.

OLIVEIRA, A. W. S.; SILVA, I. G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.40, n.2, p.204-208, 2007.

OMS – Ciclo Evolutivo. adaptado da **Organização Mundial da Saúde (OMS)** <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>>. Disponível em: <<http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/GeneroTrypanosoma.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2009.

PENARANDA-CARRILLO, R. et al. Avaliação do impacto das ações de controle vetorial da doença de Chagas através do inquérito sorológico em Mambá/Buritinópolis, Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.331-338, 2002.

PHILLIPS, A. JANIES, D., WHEELER, W. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.16, n.3, p.317-30, 2000.

PINTEIRO, L. C.; VIANA, G. V. R.; GOMES, F. A. C.; VIANA, N. G. Técnicas Algorítmicas para Construção de Árvores Filogenéticas. **Revista Científica da Faculdade Lourenço Filho**, v. 4, n. 1, 2005.

PINTO, A. Y. N.; FARIAS, J. R., MARCAL, A. S. Doença de Chagas aguda grave autóctone da Amazônia brasileira. **Revista Paraense de Medicina**, v.21, n.2, p.07-12, 2007.

PIRES, H. H. R.; BORGES, E. C.; ANDRADE, R. E.; LOROSA, E. S., DIOTAIUTI, L. Peridomiliary infestation with *Triatoma sordida* Stål, 1859, in the county of Serra do Ramalho, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, 1999.

RIBEIRO, A. L. P., ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.3, 1998.

ROCHA, D. S. et al. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.6, p.591-595, 2004.

ROCHA, D. S. et al. Description of eggs and nymphal instars of *Triatoma baratai* Carcavallo, Jurberg, 2000, based on optical and scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v.2064, p.1–20, 2009.

ROSA, J. A. et al. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.257-264, 1992.

ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S.; CILENCE, M., BELDA NETO, F. M. 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, p.363-375, 1999.

ROSA, J. A. et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* strains from *Triatoma sordida* collected in peridomestic environment in Santo Inácio, Bahia. **XXXI Annual meeting on basic research in Chagas' disease**. Caxambu, MG, 2004.

SAINZ, A. C.; MAURO, L. V.; MORIYAMA, E. N., GARCÍA, B. A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. **Genética**, v.121, p.229–240, 2004.

SAITUO, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–25, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 3 ed. v.1, 2001.

SCHMUNIS, G. A., DIAS, J. C. P. La reforma del sector salud, descentralización prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.2, p.117-23, 2000.

SCHMUNIS, G. A. Oficina Sanitária Panamericana, Organização mundial de Saúde. Washington, DC-USA. In: BERNER, Z.; ANDRADE, Z., BARRAL NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética** – Um guia prático. 3 ed. Ribeirão Preto: Holos, 2007.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the Triatominae. In: SERVICE, M. W. **Biosystematics of Haematophagous Insects**. Oxford, England, Clarendon Press. p.285-312, 1988.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics and evolution of the Triatominae. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, p.89–92, 2000.

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

SESSA, P. A.; PIMENTEL, R. R.; FERREIRA, A. L., FALQUETO, A. Soroprevalência da doença de Chagas em crianças em idade escolar do Estado do Espírito Santo, Brasil, em 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.6, p.1765-1769, 2002.

SILVA, I. G.; CAMARGO, M. F.; ISAC, E., SANTOS, A. H. Ciclo evolutivo de *Triatoma williami* Galvão, Souza, Lima, 1965 (Hemiptera, Reduviidae), em condições de laboratório. **Revista Goiana de Medicina**, v. 42, n. 1, p. 1-4, 1997.

SILVA, M. B. A. et al. Morfologia comparada dos ovos e ninfas de *Triatoma vanda* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau, Lent, 2002 e *Triatoma williami* Galvão, Souza, Lima, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.6, p.649-661, 2005a.

SILVA, R. A. et al. Ampliação de raio de pesquisa de triatomíneos na atividade de atendimento às notificações em área de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.4, p. 339-343, 2005b.

SILVEIRA, A. C.; FEITOSA, V. R., BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.36, p.15-312, 1984.

SOARES, R. P. P.; PIRES, H. H. R., DIOTAIUTI L. Estudos sobre a capacidade de vôo do *Triatoma sordida* sob condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, n.3, p.84-85, 1996.

SOUTO, R. P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.83, p.141-152, 1996.

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

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectores, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2008.

STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; PEDROSO, A., ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.73-80. 2003

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., CERON, C. R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.11, n.1, p.44-7, 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 22, p. 4673-80, 1994.

TORRES, L. D.; DIAS, J. C. P. **Triatomíneos e doença de chagas** : manual prático para identificação e manejo em laboratório. Belo Horizonte : Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, 1982

USINGER, R. L. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. U.S. **Public health bulletin**, v.288, p.1-83, 1944.

USINGER, R. L.; WYGODZINSKY, P., RYCKMAN, R. E. The biosystematics of Triatominae. **Annu. Revista Entomology.**, v.11, p.309-330, 1966.

VALENTE, V. C. Potencial de domiciliação de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no município de Muaná, Ilha de Marajó, nordeste do Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v.32, n.5, p.595-597, 1999.

VERANO, O.T.; GALVÃO, A.B. *Triatoma costalimai* sp. n. **Revista Brasileira de Malariologia.**, v.10, p.199-205, 1958.

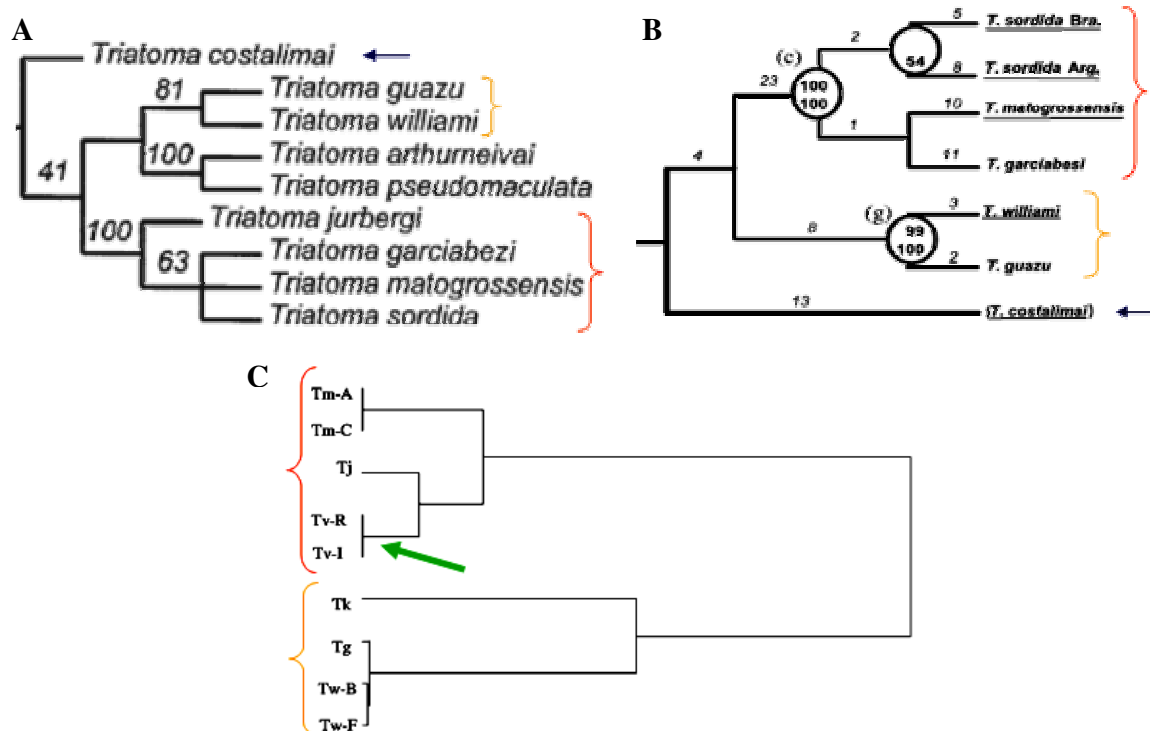
VIEIRA, C. Globalización, comercio internacional y equidad en materia de salud. **Revista. Panamericana de Salud Pública**, v.11, p.425-429, 2002.

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

WHO. **Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires, Argentina. abril de 2005, atualizado em julho de 2007. World Health Organization, 96pp, 2007.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular Biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-373, 2001.

ANEXO



Dendogramas filogenéticos construído a partir de sequências da região 16S do mtDNA (A - Hypsa et al., 2002 e B - Sainz et al., 2004) e a partir de análises isoenzimáticas (C - Noireau et al., 2002). Na legenda da figura lê-se o nome das espécies como *T. guazu* (Tg), *T. jurbergi* (Tj), *T. klugi* (Tk), *T. matogrossensis* (Tm), *T. vandae* (Tv) e *T. williami* (Tw). As espécies da região Centro-Oeste apresentam duas subdivisões (chaves vermelha e alaranjada). As setas azuis indicam *T. costalimai* e a seta verde indica a posição de *T. vandae*, em relação às outras espécies do Centro-Oeste.