

Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Programa de Pós- Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo
Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).

Jader de Oliveira
Dissertação de Mestrado

Araraquara
Junho/2015

Jader de Oliveira

Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo
Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).

Dissertação de mestrado apresentada
à Faculdade de Ciências Farmacêuticas –
UNESP, Câmpus Araraquara, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas á
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Co-orientador: Dr. Vagner José Mendonça

Aluno: Jader de Oliveira

Araraquara – SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Oliveira, Jader de

O48e Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Jader de Oliveira . – Araraquara, 2015, 90 f.

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

Orientador: João Aristeu da Rosa

Coorientador: Vagner José Mendonça

1. Morfologia. 2. Morfometria. 3. Taxonomia. 4. Filogenia. 5. Triatominae. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Mendonça, Vagner José, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Aos meus pais Jairo e Marinisa

Por toda a dedicação, pelos exemplos de força, coragem, honestidade e caráter. Obrigado por me incentivarem em todos os momentos a alcançar os meus objetivos.

In memoriam

Aos meus avós paternos Geraldo Fernandes de Oliveira e Maria do Rosário de Oliveira.

“O sonho é a satisfação de que o desejo se realize”.
Sigmund Freud

“Escolhe um trabalho de que gostes, e
não terás que trabalhar nem um dia na tua
vida”.

Confúcio

Agradecimentos

Aos meus Avós que sempre guiaram e apoaram meus estudos e trabalhos. Amo vocês.

A minha irmã Jaira exemplo de coragem, carinho e amizade. Maior presente da minha vida!

Em especial a minha esposa Paloma que foi uma pessoa maravilhosa me dando apoio, carinho em todos os momentos que precisei. Amo você!

Ao Professor Dr. João Aristeu da Rosa pela orientação, amizade e por toda confiança que depositou no meu trabalho nos momentos mais difíceis, por todo seu carisma, carinho e calma em resolver os problemas, discutir os assuntos. Resumindo, por toda a sua simplicidade de levar e assimilar a ciência com a vida de uma forma exuberante.

À Professora Dra. Mara Cristina Pinto por toda a atenção, paciência e carinho nas correções, dúvidas e discussões do laboratório.

Aos meus companheiros e companheiras de laboratório que são maravilhosos (as) desde o meu início no laboratório até os dias de hoje e a toda equipe do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara.

À equipe de limpeza do departamento de Ciências Biológicas em especial a Nice, que toda manhã nós recebe com um sorriso e um bom dia carismático.

À toda equipe da secretaria de pós graduação e a coordenação de pós graduação.

À Secretaria de Saúde do Estado da Bahia/SESAB – Divisão de Entomologia, em especial a Eduardo Oyama, Ernesto Alves, Carlos Gustavo, José Carlos Alves dos Santos e Orlando Marcos Farias de Sousa por todo apoio em campo.

À Jucimar Vaz: Agente de doença de Chagas, Centro de Controle de Endemias de SEABRA – BA por toda colaboração em campo.

Ao Núcleo de Triatomíneos/Reservatórios e Vetores/ IPB-LACEN/FEPPS/SES – RS e em especial Fernanda de Mello e Jorge Luiz Cabeleira Bernardes por todo apoio em campo.

Ao Professor Dr. Mário Cilense do Instituto de Química/ UNESP Araraquara, pela autorização e auxílio durante as etapas de processamentos das imagens no microscópio eletrônico de varredura.

Ao parceiro de departamento e amigo Fábio Carrilho Galvão por todo apoio nos momentos e nas dificuldades em Biologia Molecular.

À todos os professores que passaram pela minha vida, que com o conhecimento e paciência transmitiram as informações necessárias para que eu possa dar mais um passo a frente e seguir confiante em minha carreira, em especial agradeço a Profa Dra Teresa Kazuko Muraoka por todo apoio que me deu dentro dos quatro anos de graduação.

Ao casal de amigos Carlos Eduardo (KDU) e Marta por todo apoio que me deram ao longo do trabalho e por estarem por perto nos momentos bons e também nos momentos difíceis.

Aos meus amigos André Teco, Tiago Belintani, Vinícius, Fernando Mello, Thiago xuxa, Bart, Marinaldo, Fabio(Barata), Quem, Betão, Tacio (Bahia), Everton (Bahia), Rogério Fields, Livia, Danila Blanco, Carlos Eduardo, que de certa forma me deram apoio e energias positivas.

Ao Vagner J Mendonça pela co- orientação e amizade de longa data.

Ao Dr. José Jurberg e Dr. Cleber Galvão e a toda equipe do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos IOC, pela autorização e apoio na visita da coleção entomológica Dr. Herman Lent e Dr. Rodolfo Carcavallo.

Aos membros participantes da banca do exame de qualificação desta dissertação: Dr. Marcos Takashi Obara e Dr. Cleber Galvão.

Aos pesquisadores e professores que aceitaram a indicação para banca avaliadora de defesa desta dissertação: Dr. Cleber Galvão, Dr. Carlos Eduardo de Almeida, Dra. Mara Cristina Pinto e Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.

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

À vocês o meu reconhecimento e sincero agradecimento pelo incentivo e auxílio durante todas etapas desta dissertação.

O desenvolvimento desta dissertação foi financiado pela Fundação de Amparo
à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo (2013/08826-5)

Lista de Abreviaturas e siglas

% - porcentagem.
12S/16S – genes de subunidades ribossomais do mtDNA.
A - Base nitrogenada adenina.
ACP – Analise de componente principal.
AE – Alinhamento por espécie.
AG- Alinhamento geral.
AI – Alinhamento inicial.
BA/ES/PA/RN/SP - Estados Brasileiros Bahia, Espírito Santo, Pará , Rio Grande do Norte e São Paulo.
BPP - probabilidade posterior Bayesiana.
C - Base nitrogenada citosina.
COI – citocromo oxidase I do mtDNA.
CP1 e CP2 – Componentes principais.
CREBIO – Centro de Recurso Biológicos e Biologia genômica.
CTA – Colônia de Triatominae de Araraquara.
Cytb – citocromo b do mtDNA.
DNA – ácido desoxirribonucleico.
DNTP – desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP).
F - forward.
FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
G - Base nitrogenada guanina.
Gc8 e Gc9 – gonocoxitos.
GenBank® - banco de dados público de sequências de nucleotídeos.
Gp 8 – gonapófises.
ITS I e II – Espaçador interno transcrito I e II.
Kb – kilobase (1000 bases).
mA – Amperes.
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.
Min – minutos.
ml – mililitros.
mm – milímetro.
Mm – milimitros.
mtDNA- ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
N – Norte.
n. gen- Novo gênero.
n. sp – Nova espécie.
Ng – nanograma.
NJ - Neighbor – Joining.
°C – Graus centígrados.
Pb- pares de base.

PCR – Reação de amplificação em cadeia de polimerase de DNA utilizando um par de iniciadores.

R – reverse.

S – Sul.

SM – Microscópio eletrônico.

T – Base nitrogenada timina.

TAE - Tris-Acetato-EDTA.

uL – microlitros.

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

V – Volt.

VIII, IX e X - segmentos abdominais.

Lista de figuras

Figura 1: Esquema da metodologia para o estudo morfológico de genitálias externas femininas de espécies de Triatominae, metodologia descrita por Rosa e colaboradores.

Figura 2 – Estruturas mensuradas para o estudo morfométrico, A- cabeça, B- proboscíde, C- abdômen e D – tórax.

Figura 3: Cabeça de adulto fêmea de *T. brasiliensis* com marcação dos nove pontos de referência (landmarks) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software TPSdig (versão 1.27, Rohlf, 2001).

Figura 4: Asa de adulto macho de *T. juazeirensis* com marcação dos dez pontos de referência (landmarks) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software TPSdig (versão 1.27, Rohlf, 2001).

Figura 5: Fluxograma esquemático das três etapas de alinhamento das triplicatas. Alinhamento inicial (AI), Alinhamento por espécie (AE) e Alinhamento Geral (AG).

Figura 6: Representação do alinhamento (AG) conduzido pelo programa BioEdit das sequências do fragmento 16S mtDNA (546pb) 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: *P. megistus* (Pmeg), *T. brasiliensis* (Tbras), *T. carcavalloei* (Tcarc), *T. circumaculata* (Tcirc), *T. costalimai* (Tcost), *T. delpontei* (Tdelp), *T. garciabesi* (Tgarc), *T. guasayana* (Tguas), *T. infestans* (Tinfe), *T. juazeirensis* (Tjuaz), *T. klugi* (Tklug), *T. lenti* (Tlent), *T. maculate* (Tmacu), *T. matogrosensis* (Tmato), *T. melanica* (Tmela), *T. platensis* (Tplat), *T. pseudomaculata*

(Tpseu), *T. rubrovaria* (Trubr), *T. sherlocki* (Tsher), *T. sordida* (Tsord), *T. vandae* (Tvand), *T. petrochii* (Tpetr), *T. melanocephala* (Tmelano), *T. tibiamaculata* (Ttibi), *T. vitticeps* (Tvitti), *R. prolixus* (Rprol).

Figura 7: Genitália externa feminina, visão dorsal, por meio de MEV. A – *T. brasiliensis*, B – *T. juazeirensis*, C- *T. sherlocki*, D – *T. lenti*, E – *T. petrochii* F–*T. melanocephala*, G– *T. vitticeps*, H – *T. tibiamaculata*, I – *P. megistus* e J – *R. pictipes*; VII, VIII, X e IX– segmentos abdominais.

Figura 8: Genitália externa feminina vista posterior de A – *T. brasiliensis*, B – *T. juazeirensis*, C- *T. sherlocki*, D – *T. lenti*, E – *T. petrochii* F–*T. melanocephala*, G– *T. vitticeps*, H – *T. tibiamaculata*, I – *P. megistus* e J – *R. pictipes*; VIII, IX e X - segmentos abdominais; Gc8 e Gc9 – gonocoxitos; Gp 8 – gonapófises.

Figura 9: Genitália externa feminina vista ventral de A – *T. brasiliensis*, B – *T. juazeirensis*, C- *T. sherlocki*, D – *T. lenti*, E – *T. petrochii* F- *T. melanocephala*, G– *T. vitticeps*, H – *T. tibiamaculata*, I – *P. megistus* e J – *R. pictipes*; X e IX - segmentos abdominais; VIII – tergitos; Gc8 e Gc9 – gonocoxitos; Gp 8 – gonapófises.

Figura 10: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em cabeças de adultos fêmea de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

Figura 11: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em adultos macho de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

Figura 12: Análise da distância de Mahalanobis, árvore enraizada com *R. pictipes*; para corroborar estudos filogenéticos para esse grupo.

Figura 13: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em asas de adultos fêmea de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

Figura 14: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em asas de adultos macho de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

Figura 15: Eletroferograma gerado pelo sequenciador, com picos bem definidos e que representa o padrão de qualidade das sequências do fragmento do gene COI.

Figura 16: Dendograma filogenético baseado nas sequências da região 12S, 16S, COI e Cytb do mtDNA utilizam a análise Neighbor-Joining, com o modelo “Kimura de dois parâmetros” (Kimura2). Na legenda da figura lê-se o nome da espécie.

Figura 17: Filograma da análise bayesiana com inferência da análise combinada de sequências de triatomíneos utilizados para a reconstrução filogenética. Modelos de evolução molecular para cada partição foram HKY + G para 12S e 16S rDNA; COI foi usada para HKY + I + G; e GTR + I + G para Cytb. Valores acima dos nós indicam probabilidade posterior Bayesiana (BPP).

Lista de Tabelas

Tabela 01: Procedência e data de início das colônias das espécies utilizadas.

Tabela 02: mostrando os códigos de acesso no Genbank de genes mitocondriais (12S, 16S, COI, e fragmentos Cytb) de triatomíneos utilizados neste estudo. As sequências obtidas neste estudo estão em negrito (NE) e as que iniciam em AF foram depositadas por Garcia, Moriyama e Powell; 2001 e as iniciadas em KC foram depositadas por Justi et al 2014.

Tabela 03: Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento total de 30 adultos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Tabela 04: Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas da largura e comprimento da cabeça de 30 adultos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Tabela 05: Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento do tórax e abdômen de 30 adultos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Tabela 06: Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento dos três segmentos da proboscide de 15 adultos fêmeas de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Tabela 07: Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento dos três segmentos da proboscide de 15 adultos machos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Tabela 08: Concentração do DNA genômico em nano gramas por microlitros.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Capítulo I – Dissertação de Mestrado

Resumo

Abstract

I - Introdução	19
I. 1 - Doença de Chagas	19
I.2 - Triatomíneos	20
I.2.1 <i>Triatoma brasiliensis</i> Neiva, 1911.	23
I.2.2 <i>Triatoma juazeirensis</i> Costa & Felix, 2007.	22
I.2.3 <i>Triatoma lenti</i> Sherlocki & Serafim, 1967	22
I.2.4 <i>Triatoma melanica</i> Neiva & Lent, 1941.....	23
I.2.5 <i>Triatoma melanocephala</i> Neiva & Pinto, 1923	243
I.2.6 <i>Triatoma petrochii</i> Pinto & Barreto, 1925.....	24
I.2.7 <i>Triatoma sherlocki</i> Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata,	24
I.2.8 <i>Triatoma tibiamaculata</i> (Pinto,1926).....	24
I.2.9 <i>Triatoma vitticeps</i> (Stål, 1859).....	25
II - Objetivos	26
II.1 - Objetivo Geral	276
II.2 - Objetivos Específicos	26
III. Material e Métodos	287
III.1 - Insetos.....	287
III.2 - Estudo morfológico.....	298
III.3 - Estudo morfométrico.	309
III.4 - Análise da geometria morfométrica.....	309
III.5 - Extração do DNA gênomico.	32
III.6 - Iniciadores.....	32
III.7- Amplificação dos fragmentos por PCR	33
III.8 - Purificação do DNA amplificado	35
III.9 - Sequenciamento do DNA amplificado.....	35

III.10 - Análise filogenética	36
III.10.1 - Alinhamento	37
III.10.2 - Alinhamento inicial (AI).....	37
III.10.3 - Alinhamento por espécie (AE).....	37
III.10.4- Blast	37
III.10.5- Alinhamento geral (AG).....	38
III.10.6 - Sequências utilizadas, disponíveis em bancos de dados.....	40
IV - Resultados.....	41
IV.1 - Análise morfométrica	41
IV.2 - Estudo morfológico	46
IV.3 - Estudo da Morfometria geométrica	49
IV. 4 - Molecular	55
IV.4.1 Extração do DNA genômico	55
IV.4. 2 - Isolamento (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse.	56
IV.4.3 - Sequenciamento	56
IV.4.4 - Análises Filogenéticas	57
V - Discussão	61
VI - Conclusão.....	68
VII – Referências bibliográficas.....	70

Capítulo II – Artigos publicados

Capítulo I – Dissertação de mestrado

Resumo

O subcomplexo *Triatoma brasiliensis* compreende as espécies: *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *T. juazerensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. Essas espécies apresentam muitas questões relativas à sua biologia e filogenia. Diante dessa constatação e servindo-se de estudos moleculares, morfológicos e morfométricos avaliaram-se aspectos filogenéticos das espécies do referido complexo. Para tanto caracteres morfológicos da genitália externa feminina, foram estudadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por microscopia óptica foram desenvolvidos estudos morfométricos: geometria morfométrica de cabeças e asas, mensuração do comprimento e largura da cabeça, comprimento do tórax, abdômen e dos três segmentos da probóscide de adultos fêmeas e machos. Foram sequenciadas regiões dos genes nucleares dos espaçadores transcritos internos I e II e dos genes mitocondriais 12S, 16S, COI e CyTb e avaliadas com o intuito de propor hipóteses filogenéticas para as espécies do complexo.

Palavras-chave: Morfologia, morfometria, taxonomia, filogenia e Triatominae.

Abstract

The subcomplex *Triatoma brasiliensis* comprises species: *Triatoma brasiliensis*, *T. brasiliensis*, *T. juazerensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. These species have many questions regarding its biology and phylogeny. Given this finding and making use of molecular studies, morphological and morphometric aspects were evaluated phylogenetic species of said complex. For both morphological characters of the female external genitalia, they were studied by means of scanning electron microscopy (SEM). By optical microscopy were developed morphometric studies: morphometric geometry heads and wings, measuring the length and width of the head, thorax length, abdomen and the three segments of the proboscis of adult females and males. Sequences of nuclear genes of internal transcribed spacers I and II were sequenced and the mitochondrial genes 12S, 16S, COI and Cytb were sequenced and evaluated with the aim to propose phylogenetic hypotheses for complex species.

Keywords: morphology, morphology, taxonomy, phylogeny and Triatominae

I - Introdução

I. 1 - Doença de Chagas

Há 106 anos Carlos Chagas marcou definitivamente o meio científico ao publicar o artigo: “Nova Trypanozomiaze Humana . Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem”. Chagas identificou não somente o agente etiológico, mas o vetor, reservatório silvestre, bem como o primeiro caso humano. Temos assim que o renomado cientista descreveu toda a cadeia epidemiológica da doença, que Miguel Couto em reunião na Academia Nacional de Medicina sugeriu a denominação de “moléstia de Chagas” Chagas, 1909; Chagas Filho, 1993. Mais recentemente esse extraordinário feito foi destacado por Amato Neto e J., 2005, que se referiram ao trabalho de Chagas como “até hoje sem similares”, “sem os recursos tecnológicos disponíveis atualmente”.

A doença de Chagas é endêmica na América Latina, acomete 7 a 8 milhões de indivíduos e é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A principal via de transmissão de *Trypanosoma cruzi* ao homem ocorre por meio das fezes dos triatomíneos, correspondendo a 80% dos casos da doença de Chagas e estão relacionadas às características próprias dos vetores, baixas condições sociais e ação desordenada do homem sobre o meio ambiente (WHO, 2014).

Todas as espécies de triatomíneos podem se infectar e transmitir o protozoário *T. cruzi*, no entanto apenas algumas espécies participam efetivamente do ciclo. Assim, pode-se 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 mais comumente encontrados com a infecção são roedores, marsupiais, carnívoros, quirópteros e primatas. Os mamíferos contaminam-se provavelmente pela mucosa do sistema digestor, ao caçar e ingerir os vetores infectados, ou ao lambem os pelos impregnados com fezes contaminadas do triatomíneo. As outras classes de vertebrados – aves, répteis

e anfíbios – são refratários ao *T. cruzi*, no entanto, esses também servem como fonte alimentar para os triatomíneos (Torres e Dias, 1982; Deane, Lenzi e Jansen, 1984 e Noireau, Diosque e Jansen, 2009).

O combate ao inseto vetor é, sem dúvida, decisivo no controle da tripanossomíase americana, quer pela alta capacidade de domiciliação de determinadas espécies de triatomíneos, quer pelas próprias características da doença, tais como dificuldade de diagnóstico precoce, cronicidade, ausência de tratamento e imunização adequada ou, mesmo pela alta frequência de animais reservatórios domesticados ou domiciliados. Dessa maneira, novas informações sobre esses insetos, tanto em sua fase adulta, quanto na de ninfa ou de ovo, serão sempre importantes elementos para se estabelecer diagnósticos específicos cada vez mais precisos e que, conseqüentemente, virão a auxiliar no esclarecimento do papel de cada espécie transmissora (Barata, 1981).

I.2 - Triatomíneos

As espécies de triatomíneos ocorrem, principalmente, nas Américas, com distribuição que se estende desde o Sul dos Estados Unidos entre os Grandes Lagos (Latitude 40° N) e a província de Chubut no Sul da Argentina (Latitude 46° S). Entretanto algumas espécies como todas as seis do gênero *Linshcosteus*, mais *Triatoma amicitiae*, *T. bouvieri*, *T. cavernicola*, *T. leopoldi*, *T. migrans*, *T. pugasii*, *T. rubrofasciata* e *T. sinica* ocorrem também em outros continentes (Sherlock, 1979; Galvão e Angulo, 2006; Ceretti-Junior *et al.*, 2008).

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. Nesse aspecto destacam-se os estudos conduzidos por Jurberg, Lent e Galvão, 1997 que utilizam a genitália masculina como parâmetro taxonômico, metodologia largamente utilizada para a validação de novas espécies (Lent e Jurberg, 1967; Jurberg, Lent e Galvão, 1997).

A mais recente lista de espécies válidas da subfamília Triatominae incluiu 137 espécies, distribuídas em 19 gêneros e seis tribos (Galvão *et al.*,

2003). No entanto, esses números não refletem o cenário real, mudanças contínuas ocorrem em função das revisões taxonômicas, e novas espécies são descritas. Nesta data contam-se 148 espécies mais duas espécies fóssil e 18 gêneros reconhecidos (Galvão, 2014).

Assim, alguns grupos apresentam similaridade morfológica e para a diagnose específica são necessárias técnicas com um alto grau de sofisticação para caracterizar um táxon (Schofield, 1988; Carcavallo *et al.*, 2001; Jurberg, 2003).

Por funcionalidade esses conjuntos de espécies são agrupados em complexos específicos, que, porém não formam uma categoria reconhecida pelo código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Usinger, Wygodzinsky e Ryckman, 1966; Lent e Wygodzinsky, 1979; Carcavallo, Jurberg e Lent, 1999; Carcavallo e Jurberg, 2000 e Carcavallo *et al.*, 2001).

No entanto, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) vem sendo utilizada como uma abordagem em estudos taxonômicos de triatomíneos, com base nessa metodologia vários aspectos a respeito do *status* de espécie críticas e dos complexos começam a ser revelados (Rosa *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2012 e Rosa *et al.*, 2014)

O "complexo específico" é um conjunto de espécies e ou subespécies com semelhanças morfológicas, possíveis hibridizações e proximidade molecular nos estudos bioquímicos, como por exemplo, nas análises iso-enzimáticas e por outras abordagens. (Carcavallo *et al.*, 2001).

Para o gênero *Triatoma*, Schofield e Galvão, 2009 admitem oito complexos: "Phyllosoma, Flavida, Rubrofasciata, Protracta, Lenticularia, Dispar, Infestans e Spinolai e oito subcomplexos: Dimidiata, Phyllosoma, Brasiliensis, Infestans, Maculata, Matogrossensis, Rubrovaria e Sordida"

O "complexo *Triatoma brasiliensis*" admitido por Schofield e Galvão, 2009 conta com as seguintes espécies: *T. brasiliensis*, *T. juazerensis*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochii*, *T. lenti*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. No entanto esses dois autores, referem que é muito incerta a consideração de *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* como integrantes do "complexo

Triatoma brasiliensis”, pois ambas ocorrem no leste do Brasil e mostram algumas semelhanças morfológicas com espécies do complexo *Triatoma brasiliensis*.

I.3 - Considerações sobre as espécies estudadas.

I.3.1 *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911.

Cor geral do marrom escuro ao preto, em algum caso marrom mais leve dorsalmente; marcação amarelo acastanhado no pescoço, primeiro segmento da antena atingindo o ápice do clípeo; pronoto marrom com um par de manchas amarelas sobre as carenas longitudinais estendendo – se sobre os lobos anterior e posterior; coxas escuras; trocânteres amarelos; fêmures com base escura, claros próximo do centro, usualmente anelados; tíbias com anelação clara perto do ápice. Tamanho médio (mm): 22 – 25,5 (Lent e Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.2 *Triatoma juazeirensis* Costa & Felix, 2007.

Cor geral preto, cabeça preta e rugosa dorsalmente e lateralmente, primeiro segmento da antena atingindo o ápice do clípeo; pronoto marrom escuro a preto; trocânteres escuros com marcas claras; coxas e fêmures escuros; tíbias com porção levemente amarelada próxima ao ápice. Tamanho médio (mm): 20 – 25,5 (Costa e Felix, 2007; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.3 *Triatoma lenti* Sherlocki & Serafim, 1967

Cor geral preto, com marcações amarelas no pescoço, pilosidade curta e escassa, cabeça preta e mais longa que o pronoto, debilmente rugosa e granulosa pontuada, primeiro segmento da antena atingindo o ápice do clípeo; terceiro segmento do rostro mais curto que o segundo; pronoto totalmente preto; processo do escutelo longo, com mais da metade do corpo do escutelo; cório em geral totalmente preto; fêmures e tíbias inteiramente escuros; manchas do conexivo amarelo alaranjadas. Tamanho médio (mm): 25 – 27,5 (Lent e Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.4 *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941

Coloração geral castanho amarelado. Cabeça negra, duas vezes mais longa que larga ao nível dos olhos. Rostro robusto e negro. Primeiro artigo rostral alcançando o nível do ápice do tubérculo antenífero, segundo artigo o nível do meio dos olhos. Pescoço negro com um par de manchas claras laterais. Pronoto negro e amarelo. Lobo anterior com tubérculos discais amarelos e tubérculos laterais ausentes. Lobo posterior com um par de nítidas marcas trapezoidais amareladas. Carenas submedianas evanescentes no quarto posterior. Ângulos humerais arredondados. Escutelo negro, processo apical tão longo quanto o corpo principal do escutelo e com o ápice amarelo. Hemiélitro com cório amarelo claro, células discais inteiramente ou quase inteiramente castanho escuro; clavo inteiramente escuro; membrana esfumaçada, castanho claro amarelada; veias da membrana castanho. Pernas negras com manchas amareladas nos trocânteres; ápices das tíbias ligeiramente amarelados. Fêmures anteriores e medianos com pequenos dentículos subapicais. Fossetas esponjosas presentes somente nas tíbias anteriores dos machos, ausentes nas fêmeas. Abdômen ventral negro. Conexivo com áreas amarelas e áreas escuras de tamanho idêntico, ocupando toda a largura do conexivo; a área escura abrange a sutura intersegmental. Abdômen das fêmeas muito largo com as porções laterais dos urotergitos expostas. (Costa, Argolo e Felix, 2006; Galvão, 2014).

I.3.5 *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923

Cor geral do marrom escuro ao preto, com manchas amareladas no pescoço, cabeça preta e mais curta que o pronoto, rugosa e delicadamente granulosa; primeiro segmento da antena atingido o ápice do clípeo; genas no máximo atingindo o ápice do clípeo; pronoto marrom a preto com um par de manchas amarelas na metade anterior do lobo posterior; escutelo marrom a preto; fêmures e tíbias inteiramente escuros; pleuras e ventre do tórax e abdome polidos. Tamanho médio (mm): 25,5 – 28 (Lent e Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.6 *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925

Cor geral marrom escuro, cabeça uniformemente escura e mais longa que o pronoto, ligeiramente rugosa e granulosa; primeiro segmento da antena curto, não atingindo o ápice do clipeo; terceiro segmento do rostro mais curto que o segundo, pronoto marrom escuro com tubérculos discais reduzidos e um par de marcas amarelas nos úmeros; processo apical do escutelo amarelo; cório marrom com manchas amarelas na base e ápice; fêmures e tíbias inteiramente escuros; conexivo marrom escuro nas porções anterior e posterior; amarelo centralmente. Tamanho médio (mm): 17 – 23 (Lent e Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.7 *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002.

Cor geral castanho escuro a preto, apresentando manchas laranja-avermelhada semi circulares do conexivo, clavo e cório escuros e membrana de coloração marrom a cinza; cabeça, pronoto e cório inteiramente pretos; primeiro segmento da antena curto, não atingindo o ápice do clipe; asas anteriores chegando até a base do sexto tergito abdominal; trocânteres escuros; fêmures escuros com anel laranja avermelhado no centro; tíbias inteiramente escuras. Tamanho médio (mm): 19 – 26 (Papa *et al.*, 2002; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.8 *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926)

Cor geral preto, com marcas vermelhas e marrons em luz laranja; pilosidade curto e escasso, imperceptível; cabeça preta, ligeiramente granulosa- pontuada, visivelmente rugosa lateralmente; primeiro segmento da antena quase atingindo o ápice do clipeo; pronoto escuro com áreas vermelho alaranjadas nas margens laterais e posterior, ângulos anterolaterais e um par de faixas sobre as carenas e tubérculos discais; fêmures predominantes

escuros; tíbias claras exceto pelo ápice; conexivo com manchas escuras largas localizadas logo após as suturas inter segmentares. Tamanho médio (mm): 29 – 33 (Lent e Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2014).

I.3.9 *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859)

Cor geral castanho muito escuro tendendo para preto, com marrom avermelhado ou vermelho-alaranjado; cabeça mais curta que o pronoto, preta com faixa longitudinal mediana vermelha; primeiro segmento da antena atingindo ou passando pouco o ápice do clipeo; genas no máximo atingindo o ápice do clipeo; pronoto preto com três pares de manchas vermelhas; depressão central do escutelo vermelha; pleuras e ventre do tórax e abdome foscas. Tamanho médio (mm): 27,5 – 38 (Lent e Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2014).

Para o desenvolvimento deste projeto foram selecionadas nove espécies sendo oito do complexo *T. brasiliensis* admitidas por Schofield e Galvão, 2009 e uma como grupo externo para dar suporte às análises. Essa escolha deveu-se às consultas ao GenBank, que mostrou ausência de depósitos de sequências de alguns fragmentos do gene nuclear ITS I e II e dos genes mitocondriais 12S, 16S, COI e Cytb de *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. Apesar dos diversos estudos acerca da biologia e filogenia que tem sido realizados com tais espécies, a classificação permanece com questionamentos.

Assim, essas nove espécies foram estudadas, por meio de ferramentas morfométricas, morfológicas e moleculares, de modo a contribuir para os estudos taxonômicos e filogenéticos dos triatomíneos.

II - Objetivos

II.1 - Objetivo Geral

Estudar os caracteres morfológicos, por meio de análise estrutural, morfométricos por meio de geometria morfométrica, bem como sequenciar os genes dos espaçadores transcritos internos I e II do DNA nuclear e genes 12S, 16S, COI e Cytb do DNA mitocondrial para as seguintes espécies: *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

II.2 - Objetivos Específicos

Examinar, por meio de microscopia eletrônica de varredura a genitália externa feminina adulta de *P. megistus*, *R. pictipes*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Avaliar, por meio de geometria morfométrica caracteres da cabeça e asas de adultos fêmeas e machos de: *P. megistus*, *R. pictipes*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Mensurar o comprimento total e largura da cabeça, tórax e abdômen; e dos três segmentos da probóscide; de adultos machos e fêmeas de *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Extrair DNA genômico para execução da amplificação por meio de PCR dos genes dos espaçadores transcritos internos I e II do DNA nuclear e genes 12S, 16S, COI e Cytb do DNA mitocondrial para as seguintes espécies: *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Sequenciar e analisar os fragmentos do DNA nuclear para as seguintes espécies: *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Depositar em banco de dados as novas seqüências obtidas, disponibilizando-as para posteriores estudos sobre essas espécies.

Propor hipóteses filogenéticas, relacionando essas espécies aos seus grupos mais próximos, de acordo com a análise de cada um dos fragmentos sequenciados.

III. Material e Métodos

III.1 - Insetos

Os exemplares 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), sob a responsabilidade do professor Dr. João Aristeu da Rosa. As informações relativas às espécies que foram estudadas estão referidas a seguir na tabela 01.

Tabela 01. Procedência e data de início das colônias das espécies utilizadas.

Espécies	(CTA)	Procedência	Data de inicio da colônia
<i>T. brasiliensis</i>	224	Pedra do Sino/RN	22/07/2010
<i>T. juazeirensis</i>	250	Curaça/BA	25/01/2013
<i>T. lenti</i>	-	Macaúbas/BA	20/10/2013
<i>T. melanocephala</i>	219	Jequié/Ba	08/10/2009
<i>T. petrochii</i>	239	Caicó/RN	10/05/2011
<i>T. sherlocki</i>	-	Bahia	2009
<i>T. tibiamaculata</i>	195	Mogi – Guaçu/SP	17/06/1986
<i>T. vitticeps</i>	198	Guarapari/ES	01/11/1979
<i>P. megistus</i>	030	Ortigueira/PA	11/02/1985
<i>R. pictipes</i>	072	Belém/ PA	-

II.2 - Estudo morfológico.

As genitálias externas de fêmeas adultas de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* foram limpas em aparelho de ultra-som, desidratadas em série alcoólica, secas em estufa a 45° por 20 min e em seguida fixados em pequenos cilindros de alumínio com esmalte incolor. A seguir foram metalizadas por “sputtering” durante dois minutos com potência de 10mA em aparelho da marca Edwards, segundo (Rosa *et al.*, 2010).

Após o processo de metalização as amostras foram observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) Topcon SM-300, segundo (Rosa *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2010).

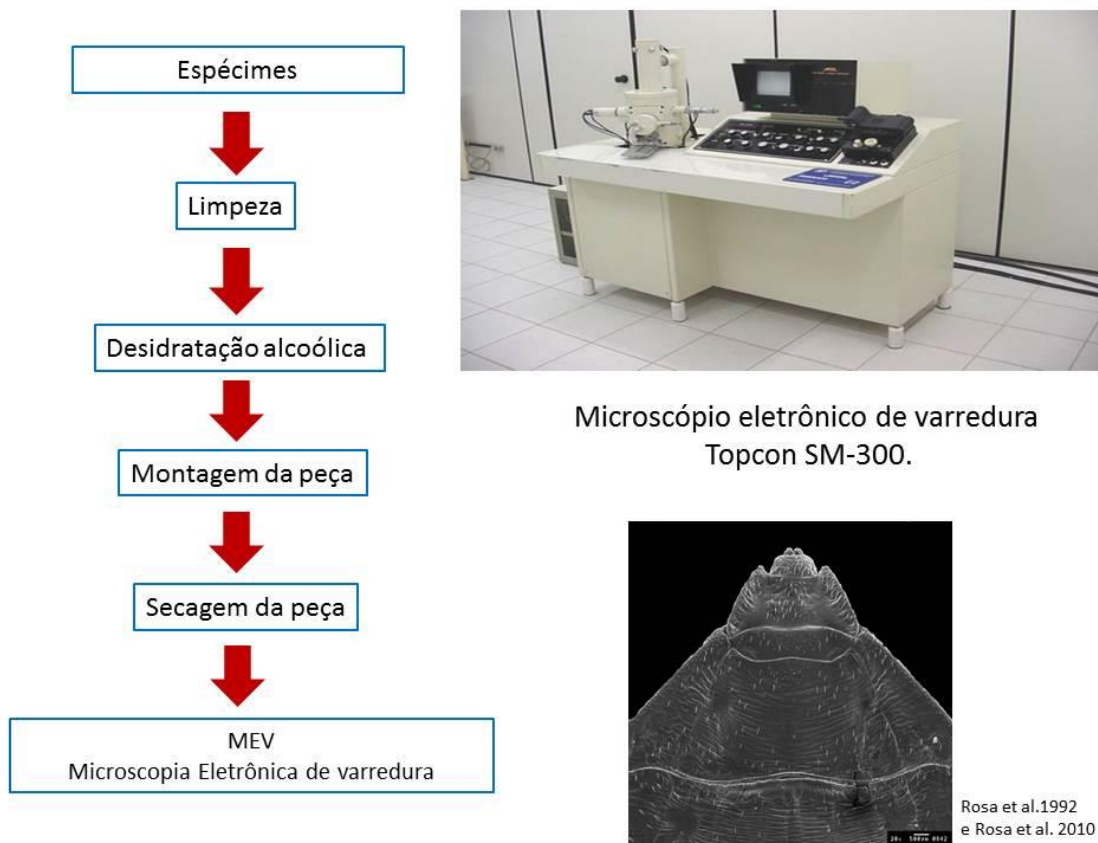


Figura 1 – Esquema da metodologia para o estudo morfológico de genitálias externas femininas de espécies de Triatominae, metodologia descrita por Rosa e colaboradores.

III.3 - Estudo morfométrico.

Para a mensuração foram utilizados 15 exemplares adultos (fêmea e macho) de todas as espécies, as mensurações foram feitas ao microscópio estereoscópio Leica MZ APO e sistema de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus.

De todos os adultos foram mensurados os seguintes parâmetros: comprimento total do corpo, cabeça, tórax e abdômen e comprimento dos três segmentos da probóscide, os dados obtidos foram organizados no programa de planilha eletrônica Excel 2007 e foram apresentados em forma de tabela (Dujardin *et al.*, 1999).

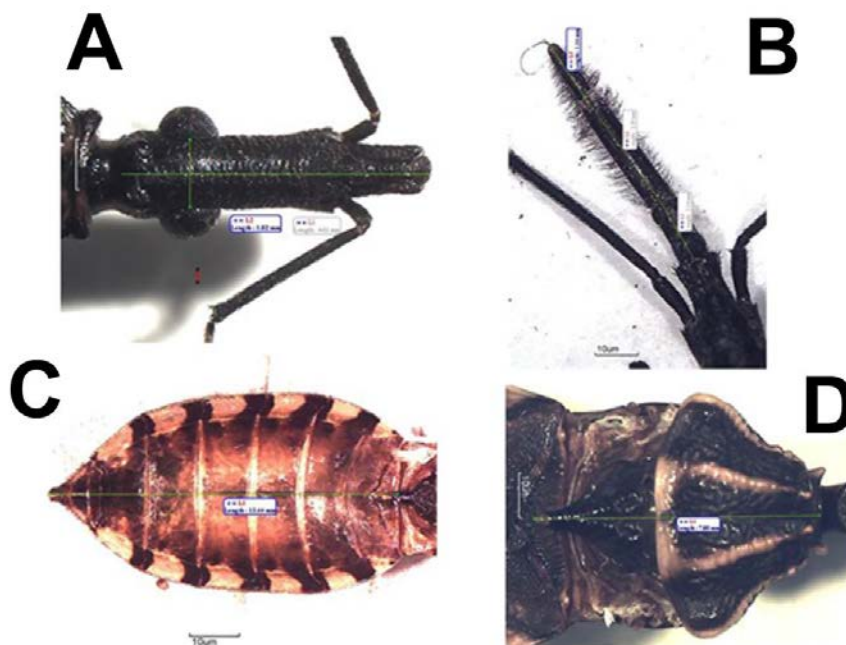


Figura 2 – Estruturas mensuradas para o estudo morfométrico, A- cabeça, B- proboscíde, C- abdômen e D – tórax.

III.4 - Análise da geometria morfométrica.

Para a análise da geometria morfométrica da cabeça e asa foram utilizados 30 exemplares de adultos (fêmeas e machos). As imagens foram feitas em microscópio estereoscópio Leica MZ APO e sistema de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus.

Foram recolhidos adultos de, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* dos quais se tomaram aleatoriamente 30 fêmeas e 30 machos com o objetivo de obter os pontos de referencias (landmarks), determinando-se um número padrão para cada estrutura ou região com base em (Jaramillo O, Castillo e Wolff E, 2002; Schachter-Broide *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2005 e Aldana *et al.*, 2011).

As cabeças dos adultos foram fixadas em uma lâmina de vidro com fita dupla adesiva para serem fotografadas. As cabeças tiveram 9 pontos de referências (*landmarks*) segundo Jaramillo O, Castillo e Wolff E, 2002 com modificações (Figura 2).



Figura 3: Cabeça de adulto fêmea de *T. brasiliensis* com marcação dos nove pontos de referência (*landmarks*) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software TPSdig (versão 1.27, Rohlf, 2001).

Após o registro das imagens, foram obtidos os pontos de referências (*landmarks*) seguindo o padrão definido por (Jaramillo O, Castillo e Wolff E, 2002).

As asas dos adultos foram fixadas em uma lâmina de vidro com lamínula para serem fotografadas. As asas tiveram 10 pontos de referências (*landmarks*) segundo García-Alzate *et al.*, 2014 com modificações (Figura 3).

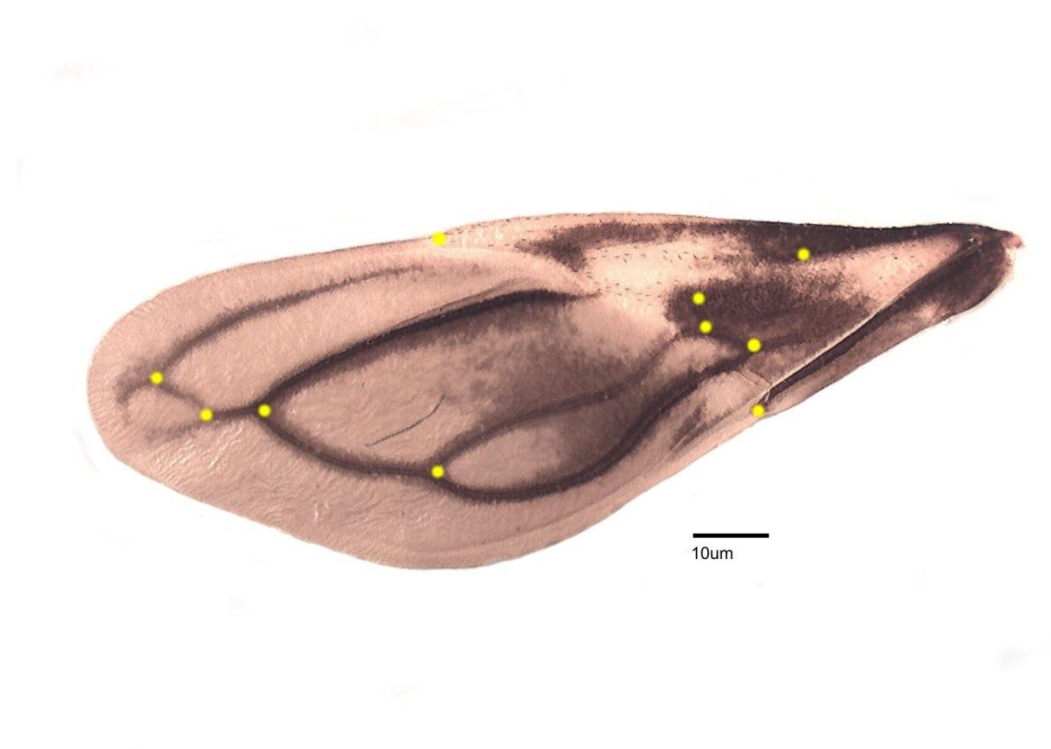


Figura 4: Asa de adulto macho de *T. juazeirensis* com marcação dos dez pontos de referência (*landmarks*) utilizados como coordenadas na morfometria geométrica, por meio do software TPSdig (versão 1.27, Rohlf, 2001).

Na sequência, as coordenadas foram incluídas num método ortogonal generalizado de superposição de mínimos quadrados de “Procrustes”, a fim de ajustar as figuras sobre um ponto comum, o tamanho centroide, por meio de movimentos de rotação, translação e escalamento. Para cada espécime, foi calculado o tamanho centroide e, componentes uniformes X e Y, onde o componente uniforme X mostra o esticamento ao longo do eixo X da

configuração e, o componente Y explica dilatações ou compressões ao longo do eixo Y.

As coordenadas foram submetidas a uma análise multivariada de componentes principais (ACP), o número de variáveis seja ao menos a metade do valor do número de indivíduos. A partir dos componentes principais obtidos nessa análise construímos um mapa fatorial com os dois primeiros componente principal ("*eigenvalues*", CP1 e CP2) para observar a diferenciação das espécies, para todas as nove espécies em cada sexo separadamente.

III.5 - Extração do DNA gênomico.

O DNA genômico dos triatomíneos foi extraído segundo protocolo Bargues e Mas-Coma, 1997. O tecido de escolha foi o da musculatura da perna, por ser livre de microrganismos contaminantes.

Foram utilizados os três pares de pernas do exemplar, que foram retiradas com auxílio de pinças entomológicas e posteriormente foram trituradas em tubos de Eppendorfs de 1,5 ml, adicionando 20uL de proteinase K (100mg/mL). Após rompimento das estruturas do exoesqueleto, adiciona-se tampão de lise incubando-se os tubos a 37°C por uma hora.

A extração do DNA obtido foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A corrida do gel é realizada horizontalmente e orientada por um campo elétrico constante. Cada amostra de DNA corre por aproximadamente 30 minutos a 100V utilizando tampão TAE 1X. A migração do DNA (conjugado ao GelRed) foi analisada em luz ultravioleta em transluminador (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989).

O fragmento de DNA amplificado foi selecionado de acordo com a especificidade e velocidade da evolução do gene, bem como foi consultado o banco de sequencias GENBANK e observou se a ausência de sequências relacionadas aos genes ITS I e II do DNA nuclear e genes 12S,16S, COI e Cytb do DNA mitocondrial para algumas das nove espécies estudadas.

III.6 - Iniciadores:

Os primers utilizados para a amplificação dos fragmentos foram: AT(G/A) AAC AGT AAT T(T/C)(G/A) TAA TC e GCA TAA T(T/C) TAG AGC

T(A/T) AA(G/A) TC para 12S (García e Powell, 1998); CTC CTG TTT AAC AAA AAC AT e AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA para 16S (Lyman *et al.*, 1999); GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G e TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA para COI (Folmer *et al.*, 1994); GGA CGW GGW ATT TAT TAT GGA TC e GCW CCA ATT CAR GTT ART AA para Cytb (Monteiro *et al.*, 2003) e para *T. petrochii* um novo primer Reverse foi desenhado por (Macet P, 2015) e está sendo descrito nessa dissertação e será lançado juntamente com o artigo, segue a sequência: TGG ACG WGG WAT TTA TTA TGG ATC CTA CAA ACT AAT CAT AAC TTG AAT AAT AGG TGT TAT TAT ACT ATT CAC CAT TAT AGG AAC TGC CTT CCT AGG CTA CGT GCT CCC CTG AGG TCA GAT ATC TCT ATG AGG AGC TAC AGT TAT TAC CAA CCT TCT ATC TGC CAT CCC TTA CTT AGG CAA TGA TCT TGT AAA ATG ACT ATG AGG AGG ATT CTC CGT AGA TAA CGC CAC CTT AAC ACG ATT CTT TGC CCT CCA TTT CCT ACT CCC ATT TAT TAT TGC TGC CCT CAC AAT AAT CCA TCT ATT ATT TTT ACA CCA AAC AGG CTC AAG AAA CCC ATT AGG ATT AAT AAA AAA CTT CGA TAA AAT CCC ATT CCA TCC TTA TTT TTC AAT TAA AGA TTT AAT AGG AGT ATC AAT TAC ATT AAT ACT ATT TAT CTT ACT CAA CTT ATG AGA ACC GCG CAT TCT AGG AGA CCC AGA AAA TTT TAT CCC AGC AAA CCC TTT AGT TAC TCC AGT TCA CAT TCA ACC CGA ATG ATA CTT CCT ATT CGC ATA TGC TAT CTT ACG ATC AAT CCC TAA CAA ACT CGG AGG AGT TAT TGC GAT AGT ATC CTC AAT CGC AAT ATT ATA ATT CTC CCA TTT TCC AAC AAA AGA AAA TTC CAA GGC CTA ACA TTT TAC CCA ATA GGA CAA ATT ATA TTC TGA TCA TTA ACA ACT ATC CTA ATT CTT TTA ACA TGA ATC GGA GCA para o gene Cytb.

Os fragmentos ITS 1 e ITS 2 foram amplificados com primers desenhados por Cláudia Solano Rocha (dados não publicados).

III.7- Amplificação dos fragmentos por PCR:

Para as reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR) foi utilizado o termociclador T100TM Thermal Cycler – BIORAD. A amplificação dos fragmentos de interesse foram realizadas utilizando a seguinte condição de reação:

Genes 12S e 16S :

- Desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
- Desnaturação (94°C, por 60 segundos)
- Anelamento (50°C, por 60 segundos),
- Extensão (72°C, por 60 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.

35 ciclos

Gene COI

- Desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 3 minutos;
- Desnaturação (94°C, por 60 segundos)
- Anelamento (45°C, por 90 segundos),
- Extensão (72°C, por 90 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 10 minutos a 72°C.

35 ciclos

Gene Cytb

- Desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 3 minutos;
- Desnaturação (94°C, por 60 segundos)
- Anelamento (45°C, por 90 segundos),
- Extensão (72°C, por 90 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 10 minutos a 72°C.

35 ciclos

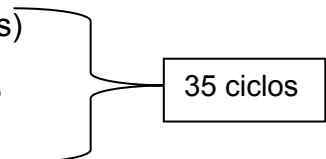
Gene ITS I

- Desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
- Desnaturação (94°C, por 60 segundos)
- Anelamento (60°C, por 60 segundos),
- Extensão (72°C, por 60 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.

35 ciclos

Gene ITS II

- Desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
- Desnaturação (94°C, por 60 segundos)
- Anelamento (53°C, por 60 segundos),
- Extensão (72°C, por 60 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.



35 ciclos

Para a amplificação dos fragmentos de DNA utilizou-se 1 µl de cada primer, 1 µl dNTP, 0,5 µl de Taq polimerase de alta fidelidade (*Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity – Invitrogen*) com sua respectiva solução tampão e cloreto de magnésio, além de 3 µl de DNAg e água deionizada para completar o volume de 50 µl. O fragmento amplificado foi avaliado em gel de agarose 1%, utilizado peso molecular (O' GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder-Fermentas) com padrão de 75,200,300,400,500,700,1.000,1.500 e 2.000 pb. O produto da amplificação foi estocado em freezer (-20°C).

III.8 - Purificação do DNA amplificado

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

III.9 - Sequenciamento do DNA amplificado.

O sequenciamento foi realizado no CREBIO – FCAV – UNESP/Jaboticabal –SP, foram utilizados o produto purificado nos sequenciadores da *Applied* (Life Technologies) ABI3100 e ABI3730XL, que utilizam o *BigDye* na versão 3.1. A quantidade das sequências obtidas foi avaliada, por meio da análise do eletroferograma, com auxílio do programa “*Electropherogram quality analysis*”, (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>).

III.10 - 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 Aligment 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 duas para cada espécie (duplicata); 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® (Figura 03)

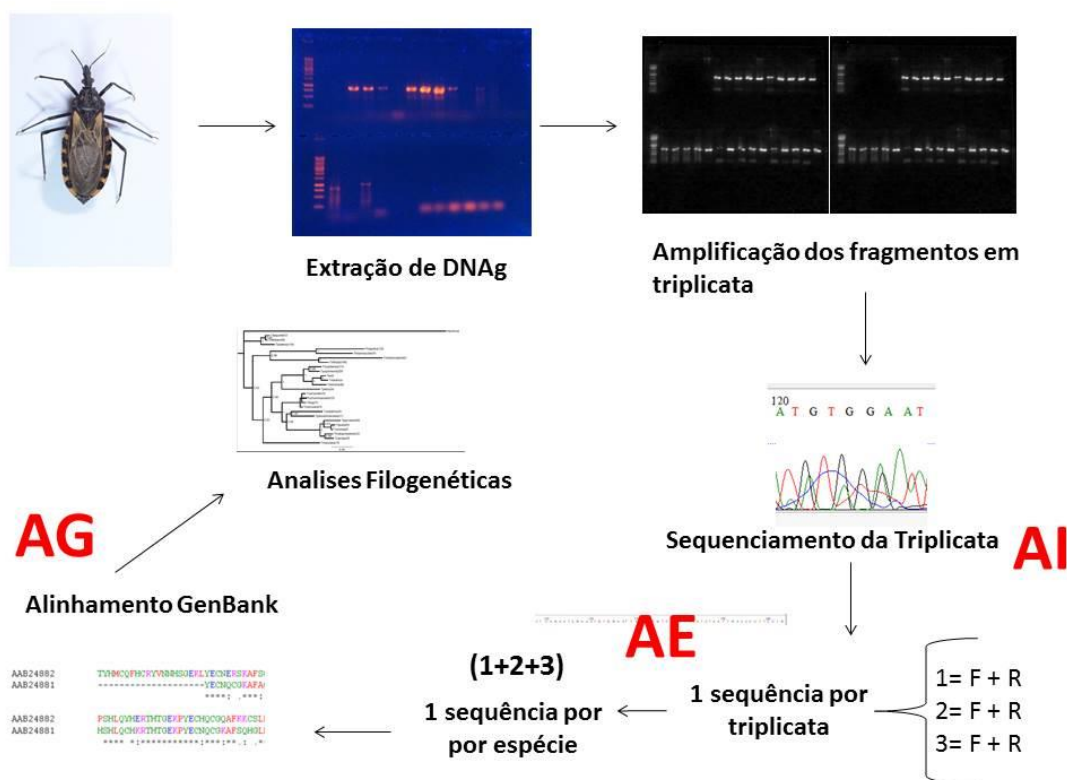


Figura 05: Fluxograma esquemático das três etapas de alinhamento das triplicatas. Alinhamento inicial (AI), Alinhamento por espécie (AE) e Alinhamento Geral (AG).

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se do programa Mega 6.0.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) e os parâmetros analíticos de máxima parcimônia (Maximum Parsimony – MP) e de distancia.

III.10.1 - Alinhamento

Para todos os genes o alinhamento foi realizado em três etapas (Figura 03) e as sequências consensos foram geradas com o auxílio do programa BioEdit; os alinhamentos foram obtidos utilizando se do programa MEGA 6.1.

III.10.2 - Alinhamento inicial (AI)

Em uma primeira etapa, foram alinhadas as sequências R e F dos fragmentos de cada uma das espécies estudadas. A partir de alinhamento foi extraída uma sequência consenso para cada sequenciado, dessa forma, cada espécie apresentou três sequências (consensos – entre R e F) uma para cada triplicata (Figura 04).

III.10.3 - 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 terceira cópia relativa ao fragmento sequenciado para aquela espécie ou exemplar (AE) (Figura 04).

III.10.4- Blast

Para certificar se as sequências obtidas para 12S, 16S, COI e Cytb os fragmentos foram realmente as esperadas, utilizou se a ferramenta BLAST. No BLAST foram utilizadas as sequências obtidas para os fragmentos 12S, 16S, COI e Cytb 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-evalue.

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.

III.10.5- Alinhamento geral (AG)

Em uma terceira etapa de alinhamentos, todas as sequências organizadas na etapa AE foram alinhadas com sequências do fragmento 12S (305 pb), 16S (546pb), COI (397pb) e Cytb (560pb) de Triatominae disponíveis no GenBank®, para enraizar as árvores filogenéticas geradas, *Rhodnius prolixus* foi utilizado como grupo externo (Figura 5)

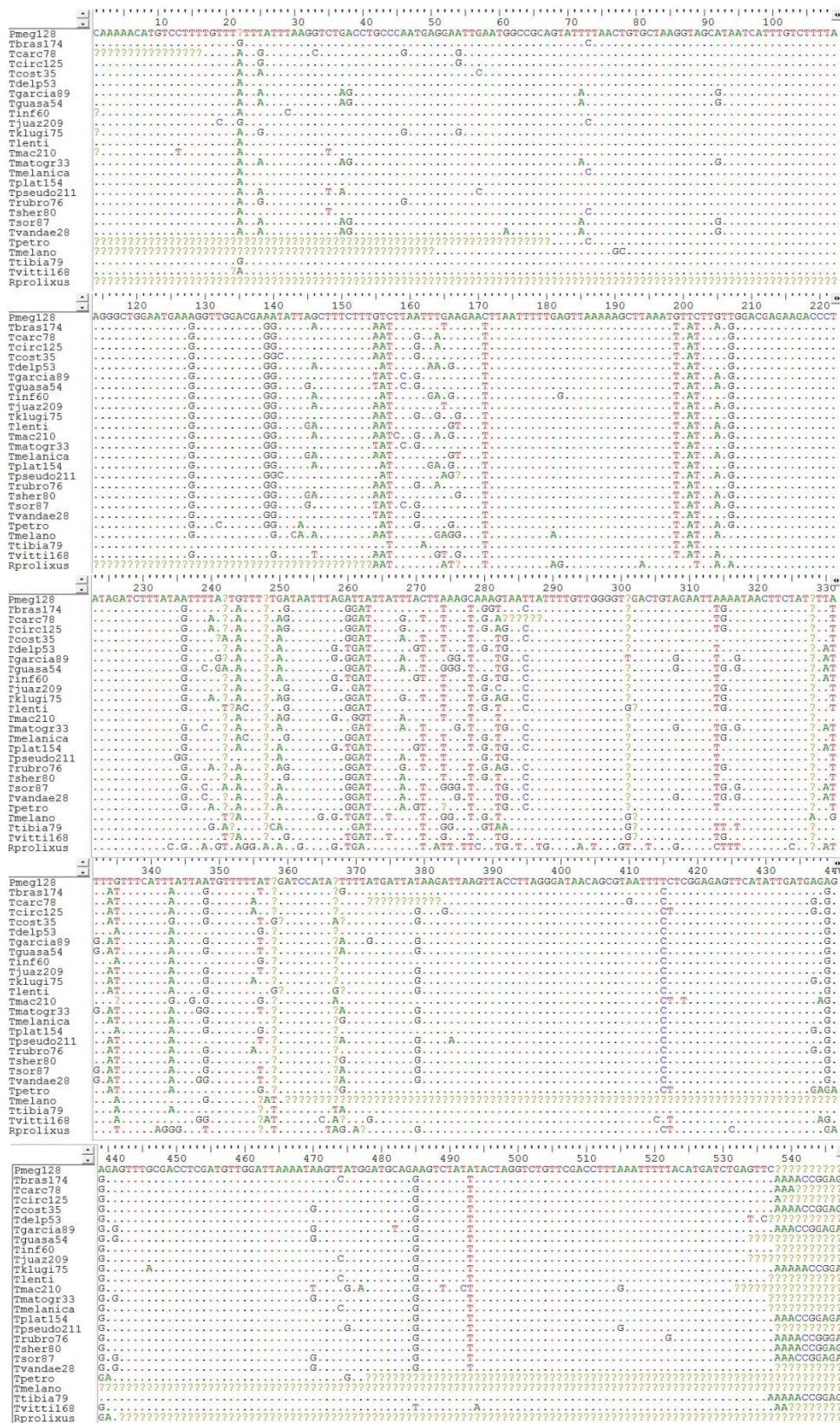


Figura 6 - Representação do alinhamento (AG) conduzido pelo programa BioEdit das sequências do fragmento 16S mtDNA (546pb) e de sequências disponíveis no GenBank®, com seus respectivos números de acesso. Na legenda da figura lê se o nome da espécie, seguida do número da colônia

estudada: *P. megistus* (Pmeg), *T. brasiliensis* (Tbras), *T. carvalhoi* (Tcarc), *T. circumaculata* (Tcirc), *T. costalimai* (Tcost), *T. delpontei* (Tdelp), *T. garciabesi* (Tgarc), *T. guasayana* (Tguas), *T. infestans* (Tinf), *T. juazeirensis* (Tjuaz), *T. klugi* (Tklug), *T. lenti* (Tlent), *T. maculata* (Tmacu), *T. matogrosensis* (Tmato), *T. melanica* (Tmela), *T. platensis* (Tplat), *T. pseudomaculata* (Tpseu), *T. rubrovaria* (Trubr), *T. sherlocki* (Tsher), *T. sordida* (Tsord), *T. vandae* (Tvand), *T. petrochii* (Tpetr), *T. melanocephala* (Tmelano), *T. tibiamaculata* (Ttibi), *T. vitticeps* (Tvitti), *R. prolixus* (Rprol).

III.10.6 - Sequências utilizadas, disponíveis em bancos de dados.

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

Tabela 02: mostrando os códigos de acesso no Genbank de genes mitocondriais (12S, 16S, COI, e fragmentos Cytb) de triatomíneos utilizados neste estudo. As sequências obtidas neste estudo estão em negrito (NE) e as que iniciam em AF foram depositadas por (García e Powell, 1998) e as iniciadas em KC foram depositadas por (Justi *et al.*, 2014).

Espécies	12S	16S	COI	Cytb
<i>T. delpontei</i>	AF324510	KC248999	KC249330	KC249248
<i>T. infestans</i>	AF021197	KC249016	KC249351	KC249257
<i>T. platensis</i>	AF021200	KC249047	-	KC249274
<i>T. carvalhoi</i>	-	KC248991	KC249322	KC249244
<i>T. circumaculata</i>	AF021190	KC248992	KC249323	KC249245
<i>T. klugi</i>	-	KC249028	KC249356	KC249265
<i>T. rubrovaria</i>	AF021207	KC249066	KC249375	KC249286
<i>T. costalimai</i>	-	KC248997	KC249327	KC249246
<i>T. matogrosensis</i>	AF324513	KC249040	KC249361	KC249272
<i>T. vandae</i>	-	KC249082	KC249391	KC249298
<i>T. pseudomaculata</i>	-	KC249050	KC249364	KC249275
<i>T. maculata</i>	AF324512	-	-	KC249034
<i>T. sordida</i>	AF021208	KC249075	KC249384	KC249292
<i>T. garciabesi</i>	AF021196	KC249006	KC249338	KC249249

<i>T. guasayana</i>	-	KC249011	KC249343	KC249252
<i>P. megistus</i>	AF021178	KC248970	KC249308	KC249228
<i>T. vitticeps</i>	AF021217	KC249085	KC249395	NE
<i>T. tibiamaculata</i>	-	KC249068	NE	NE
<i>T. melanocephala</i>	NE	NE	NE	NE
<i>T. brasiliensis</i>	AF021187	KC248985	KC249318	KC249239
<i>T. juazeirensis</i>	NE	NE	NE	KC249263
<i>T. sherlocki</i>	NE	KC249068	KC249377	KC249288
<i>T. melanica</i>	NE	NE	NE	KC249461
<i>T. petrochii</i>	NE	NE	NE	NE

IV - Resultados

IV.1 - Análise morfométrica

As mensurações do comprimento total, comprimento da cabeça, tórax abdômen e largura da cabeça de adultos machos e fêmeas de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* são apresentadas a seguir na forma de tabelas.

Tabela 03 – Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento total de 30 adultos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. (Em **negrito** as espécies que apresentaram diferença).

Espécies	Comprimento total (média) (mm)		Desvio Padrão (mm)		Máxima (mm)		Mínima (mm)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<i>T. brasiliensis</i>	23,05	24,03	1,22	0,70	24,7	25,14	20,01	22,72
<i>T. juazeirensis</i>	21,09	23,74	0,70	0,77	22,4	25,31	20,10	22,33
<i>T. lenti</i>	25,80	28,01	0,78	0,55	27,65	28,98	24,75	26,82
<i>T. petrochii</i>	21,05	22,31	1,09	0,79	23,04	23,60	18,93	20,84
<i>T. sherlocki</i>	22,78	24,85	0,64	0,82	23,66	26,52	21,59	23,54
<i>T. melanocephala</i>	26,45	28,39	0,92	0,98	27,48	29,97	24,77	26,41
<i>T. tibiamaculata</i>	26,62	29,94	0,80	1,19	27,79	32,3	24,96	28,10
<i>T. vitticeps</i>	27,21	29,40	0,97	1,23	29,29	31,18	25,60	27,07
<i>R. pictipes</i>	18,40	20,39	0,38	0,71	19,17	21,31	17,90	18,93
<i>P. megistus</i>	27,14	30,16	1,03	0,67	29,16	31,22	24,78	28,96

Tabela 04 – Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas da largura e comprimento da cabeça de 30 adultos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Espécies	Largura cabeça (média) (mm)		Desvio Padrão (mm)		Máxima (mm)		Mínima (mm)		Comprimento cabeça (média) (mm)		Desvio Padrão (mm)		Máxima (mm)		Mínima (mm)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<i>T. brasiliensis</i>	1,12	1,14	0,09	0,08	1,24	1,26	0,88	0,96	4,59	4,57	0,29	0,17	5,04	4,85	4,01	4,33
<i>T. juazeirensis</i>	1,13	1,26	0,06	0,07	1,20	1,39	1,00	1,15	4,32	4,79	0,16	0,18	4,48	5,04	3,87	4,52
<i>T. lenti</i>	1,28	1,35	0,05	0,06	1,40	1,45	1,21	1,24	5,36	7,64	0,28	0,15	6,12	5,91	4,87	5,30
<i>T. petrochii</i>	0,89	0,95	0,03	0,06	0,93	1,02	0,81	0,84	4,48	4,60	0,23	0,26	4,98	5,03	4,16	4,16
<i>T. sherlocki</i>	1,20	1,34	0,07	0,12	1,32	1,51	1,09	1,19	5,18	5,45	0,15	0,40	5,46	5,96	4,96	4,46
<i>T. melanocephala</i>	1,26	1,40	0,07	0,06	1,37	1,48	1,09	1,24	4,23	4,49	0,21	0,19	4,48	4,87	3,83	4,26
<i>T. tibiamaculata</i>	0,95	1,03	0,05	0,04	1,03	1,09	0,83	0,96	4,85	5,16	0,24	0,17	5,22	5,52	4,42	4,81
<i>T. vitticeps</i>	1,26	1,32	0,07	0,05	1,35	1,42	1,12	1,24	4,80	4,89	0,32	0,21	5,24	5,30	4,17	4,55
<i>R. pictipes</i>	0,44	0,52	0,02	0,03	0,48	0,59	0,39	0,47	3,93	4,34	0,14	0,18	4,13	4,63	3,63	3,94
<i>P. megistus</i>	1,49	1,46	0,06	0,07	1,61	1,58	1,39	1,36	4,44	4,18	0,18	0,24	4,74	4,45	4,17	3,68

Tabela 05 – Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento do tórax e abdômen de 30 adultos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Espécies	Comprimento torác (média) (mm)		Desvio Padrão (mm)		Máxima (mm)		Mínima (mm)		Comprimento abdômen (média) (mm)		Desvio Padrão (mm)		Máxima (mm)		Mínima (mm)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<i>T. brasiliensis</i>	6,45	6,20	0,62	0,31	7,21	6,61	5,05	5,55	12,02	13,26	0,58	0,44	12,83	13,86	10,59	12,29
<i>T. juazeirensis</i>	5,80	6,45	0,25	0,22	6,28	6,74	5,33	6,07	11,17	12,50	0,48	0,52	12,03	13,54	10,26	11,66
<i>T. lenti</i>	7,44	7,64	0,36	0,30	8,11	8,18	6,88	7,20	13,05	14,84	0,43	0,40	13,6	15,47	12,17	14,15
<i>T. petrochii</i>	5,95	6,09	0,45	0,46	6,61	6,62	4,89	5,18	10,62	11,62	0,59	0,44	11,84	12,43	9,64	10,63
<i>T. sherlocki</i>	5,85	6,28	0,34	0,30	6,44	6,72	5,18	5,67	11,76	13,10	0,34	0,30	6,44	6,72	5,18	5,67
<i>T. melanocephala</i>	7,14	7,81	0,19	0,29	7,43	8,26	6,85	7,27	15,08	16,09	0,59	0,58	15,76	16,95	13,81	14,88
<i>T. tibiamaculata</i>	7,49	8,08	0,37	0,49	8,05	9,11	6,67	7,40	14,29	16,70	0,48	0,68	14,94	17,95	13,49	15,77
<i>T. vitticeps</i>	7,28	5,67	0,29	0,19	7,90	6,13	6,78	7,02	15,13	16,86	0,57	0,82	16,18	17,9	14,1	15,5
<i>R. pictipes</i>	5,12	5,67	0,17	0,19	5,41	6,13	4,81	5,35	9,34	10,38	0,26	0,44	9,84	11,08	8,95	9,58
<i>P. megistus</i>	7,58	8,30	0,36	0,40	8,28	9,09	6,79	7,64	15,14	17,68	0,59	0,42	16,38	18,49	13,82	16,88

Tabela 06 – Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento dos três segmentos da proboscide de 15 adultos fêmeas de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. (Em negrito os dois padrões de tamanho da proboscide entre as dez espécies).

Espécies	Comprimento proboscide (média) (mm)			Desvio Padrão (mm)			Máxima (mm)			Mínima (mm)		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
<i>T. brasiliensis</i>	1,23	2,42	1,19	0,13	0,09	0,11	1,34	2,66	1,32	0,80	2,30	0,80
<i>T. juazeirensis</i>	1,31	2,49	1,23	0,06	0,09	0,04	1,40	2,66	1,31	1,21	2,33	1,18
<i>T. lenti</i>	1,56	3,07	1,37	0,09	0,09	0,07	1,78	3,21	1,51	1,42	2,88	1,27
<i>T. petrochii</i>	1,19	2,81	1,29	0,09	0,21	0,92	1,29	3,11	2,22	0,92	1,53	0,90
<i>T. sherlocki</i>	1,36	2,92	1,32	0,13	0,14	0,06	1,55	3,16	1,45	1,07	2,71	1,24
<i>T. melanocephala</i>	1,16	2,46	0,98	0,06	0,12	0,05	1,26	2,63	1,07	1,06	2,18	0,9
<i>T. tibiamaculata</i>	1,68	4,26	0,90	0,12	0,23	0,06	1,95	4,73	1,04	1,49	3,93	0,78
<i>T. vitticeps</i>	1,43	2,95	1,18	0,06	0,09	0,08	1,57	3,09	1,41	1,33	2,79	1,10
<i>R. pictipes</i>	0,87	3,56	0,79	0,04	0,20	0,05	0,92	3,89	0,85	0,81	3,28	0,65
<i>P. megistus</i>	1,95	2,41	0,91	0,13	0,09	0,08	2,12	2,59	1,05	1,68	2,29	0,78

Tabela 07 – Resultados das mensurações e respectivas análises estatísticas do comprimento dos três segmentos da proboscide de 15 adultos machos de *R. pictipes*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. (Em negrito os dois padrões de tamanho da proboscide entre as dez espécies).

Espécies	Comprimento proboscide (média) (mm)			Desvio Padrão (mm)			Máxima (mm)			Mínima (mm)		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
<i>T. brasiliensis</i>	1,23	2,42	1,19	0,12	0,23	0,13	1,43	2,84	1,36	1,04	2,05	1,02
<i>T. juazeirensis</i>	1,24	2,38	1,20	0,08	0,08	0,04	1,42	2,56	1,26	1,09	2,24	1,10
<i>T. lenti</i>	1,45	2,89	1,29	0,08	0,05	0,08	1,57	2,94	1,43	1,32	2,75	1,18
<i>T. petrochii</i>	1,15	2,81	1,24	0,09	0,14	0,06	1,37	3,09	1,43	1,03	2,58	1,16
<i>T. sherlocki</i>	1,42	2,92	1,29	0,03	0,18	0,07	1,50	3,11	1,39	1,37	2,51	1,15
<i>T. melanocephala</i>	1,44	2,57	1,07	0,07	0,09	0,05	1,50	2,70	1,17	1,23	2,41	1,00
<i>T. tibiamaculata</i>	1,58	4,02	0,85	0,15	0,18	0,05	1,76	4,25	0,90	1,14	3,68	0,76
<i>T. vitticeps</i>	1,35	2,77	1,16	0,11	0,12	0,06	1,48	2,99	1,33	1,14	2,54	1,09
<i>R. pictipes</i>	0,85	3,31	0,75	0,05	0,11	0,05	0,94	3,49	0,82	0,74	3,11	0,69
<i>P. megistus</i>	1,77	2,23	0,82	0,08	0,06	0,07	1,92	2,32	0,94	1,63	2,09	0,72

V.2 - Estudo morfológico

Resultado do estudo morfológico da genitália externa feminina na posição dorsal, posterior e ventral de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. pictipes*.-

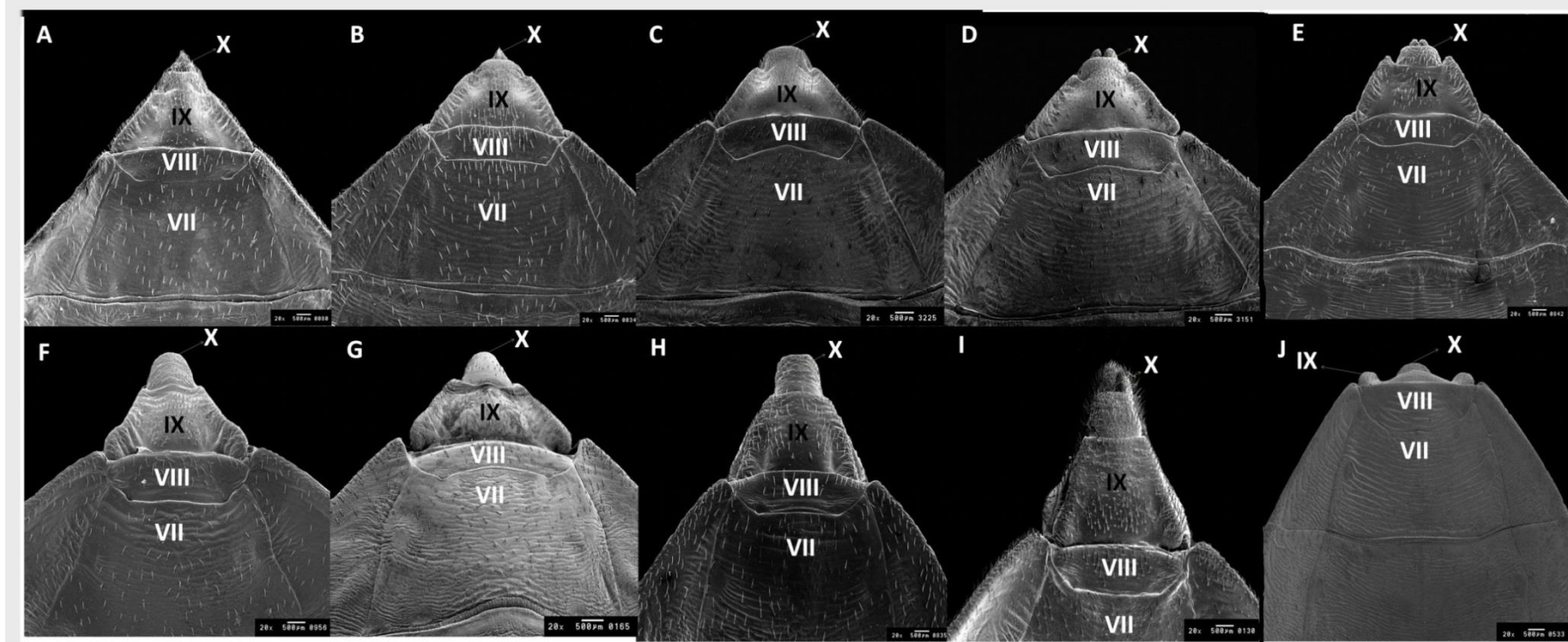


Figura 7 – Genitália externa feminina, visão dorsal, por meio de MEV. A – *T. brasiliensis*, B – *T. juazeirensis*, C- *T. sherlocki*, D – *T. lenti*, E – *T. petrochii* F–*T. melanocephala*, G– *T. vitticeps*, H – *T. tibiamaculata*, I – *P. megistus* e J – *R. pictipes*; VII, VIII, X e IX– segmentos abdominais.

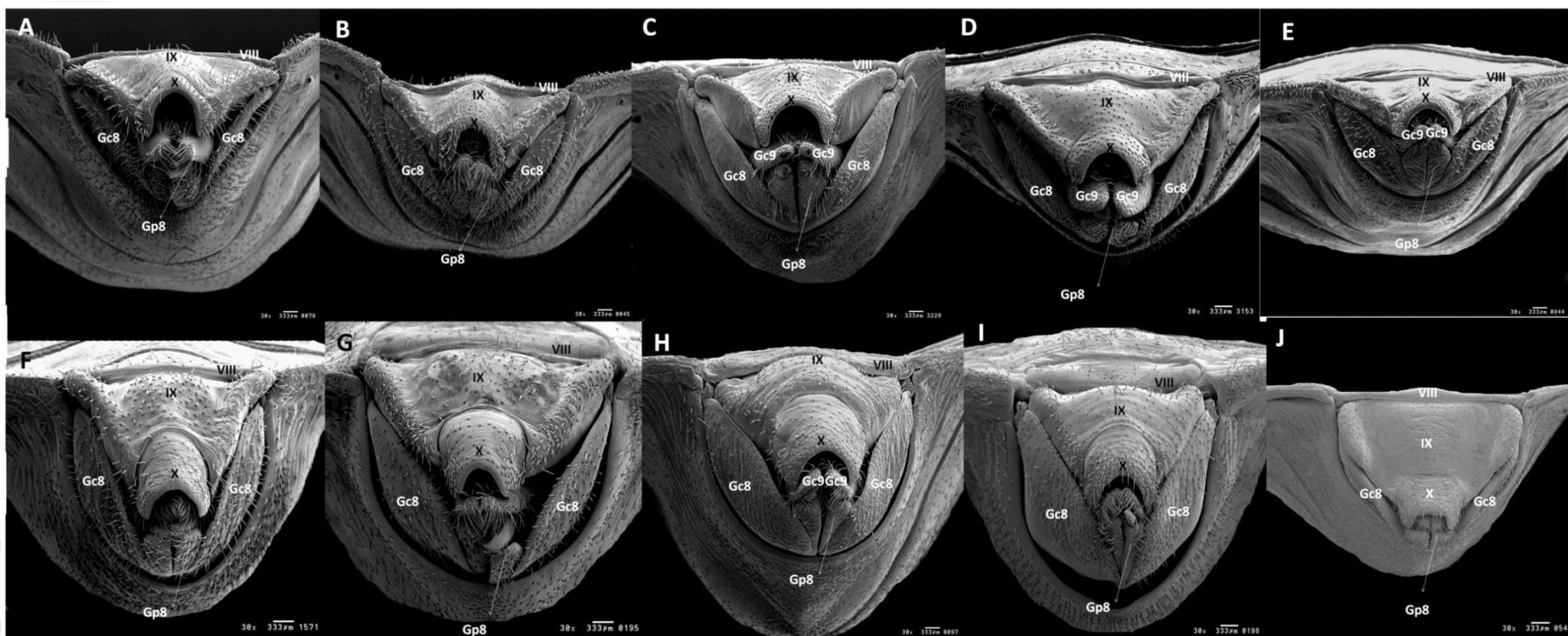


Figura 8 – Genitália externa feminina vista posterior de A – *T. brasiliensis*, B – *T. juazeirensis*, C- *T. sherlocki*, D – *T. lenti*, E – *T. petrochii* F–*T. melanocephala*, G– *T. vitticeps*, H – *T. tibiamaculata*, I – *P. megistus* e J – *R. pictipes*; VIII, IX e X - segmentos abdominais; Gc8 e Gc9 – gonocoxitos; Gp 8 – gonapófises.

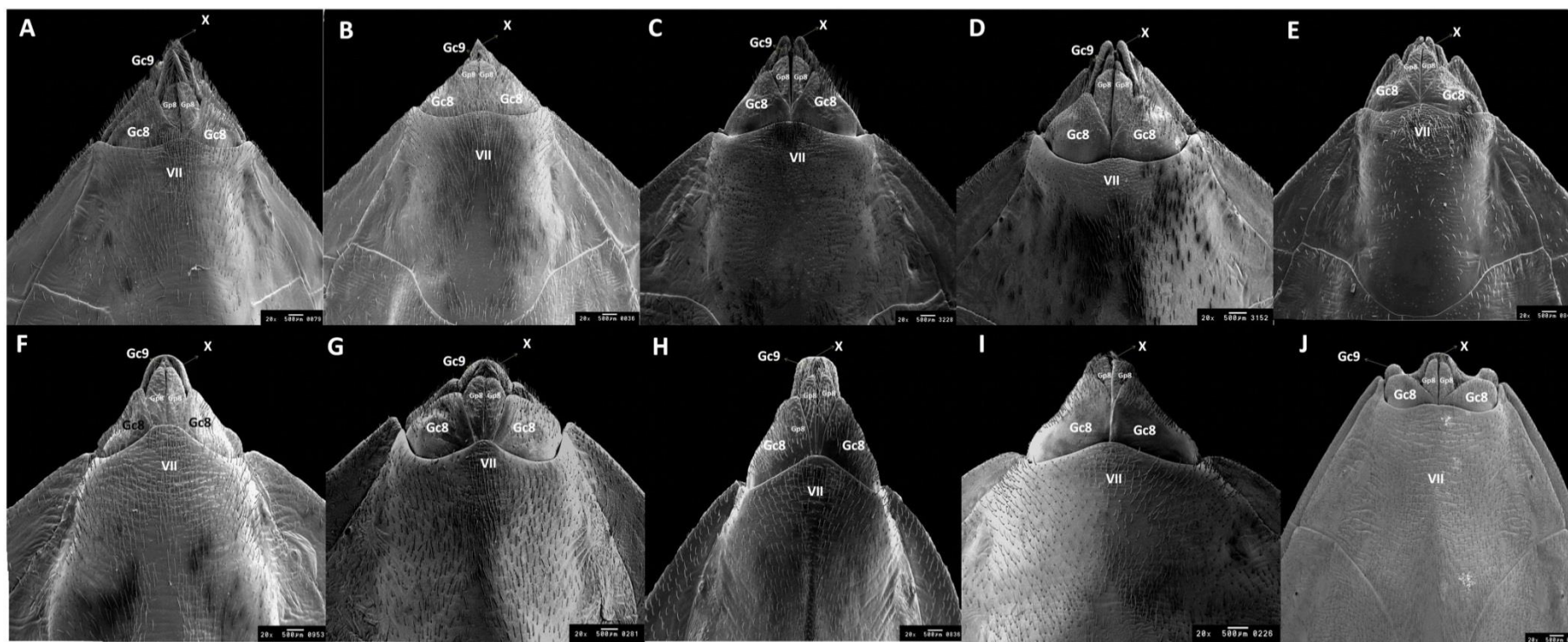


Figura 9 – Genitália externa feminina vista ventral de A – *T. brasiliensis*, B – *T. juazeirensis*, C- *T. sherlocki*, D – *T. lenti*, E – *T. petrochii* F- *T. melanocephala*, G– *T. vitticeps*, H – *T. tibiamaculata*, I – *P. megistus* e J – *R. pictipes*; X e IX - segmentos abdominais; VIII – tergitos; Gc8 e Gc9 – gonocoxitos; Gp 8 – gonapófises.

Ao examinar as imagens na posição dorsal de genitália externa feminina de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. pictipes* observou-se que podem ser distinguidas pelas seguintes características:

- 1) A forma do décimo segmento;
- 2) A forma central do nono segmento;
- 3) A forma do oitavo segmento.

Após a visualização da face posterior de genitália externa feminina de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. pictipes* observou-se os seguintes caracteres:

- 1) A forma e o comprimento do décimo segmento;
- 2) A forma da porção central do nono segmento.

Após a visualização da face ventral de genitália externa feminina de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. petrochii*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. pictipes* observou os seguintes caracteres:

- 1) A linha que divide o sétimo segmento e o oitavo gonocoxitos e gonapofise;
- 2) A forma dos oitavos gonocoxitos.

IV.3 - Estudo da Morfometria geométrica

Os resultados das análises dos componentes principais (PCA) de cabeças, para comparar as espécies fêmeas de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*, mostrou que o Componente Principal 1 representou 43,4% e o Componente Principal 2 representou 17%, juntos corresponderam a 60,4% da variabilidade total da forma e tamanho (Figura 9).

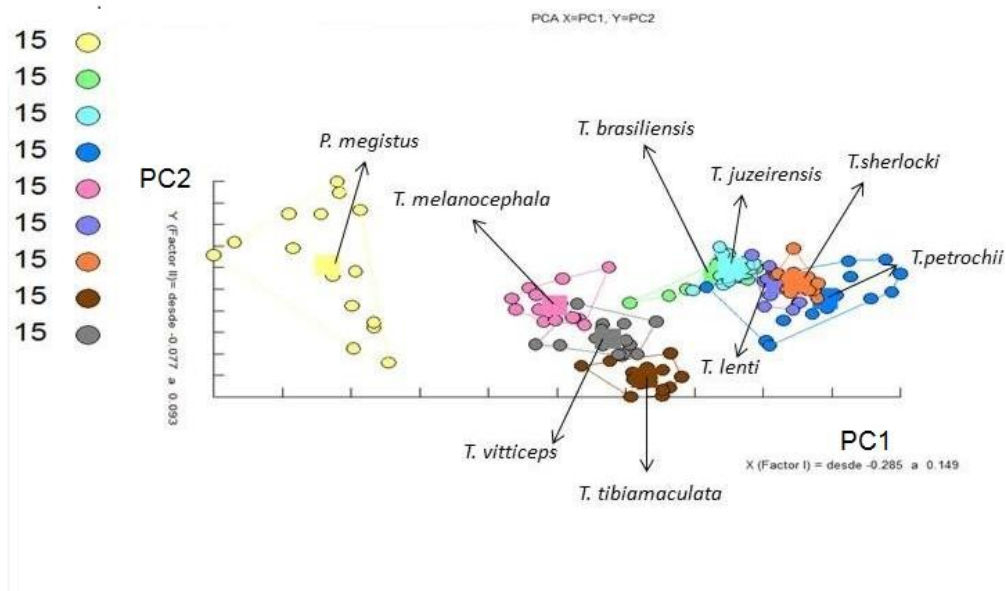


Figura 10: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em cabeças de adultos fêmea de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

Os resultados da análise dos componentes principais (PCA) de cabeças, para comparar as espécies machos de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*, mostram que o CP1 representou 36,6% e o CP2 representou 10,8 %) juntos corresponderam a 47,4% da variabilidade total da forma e tamanho (Figura 10).

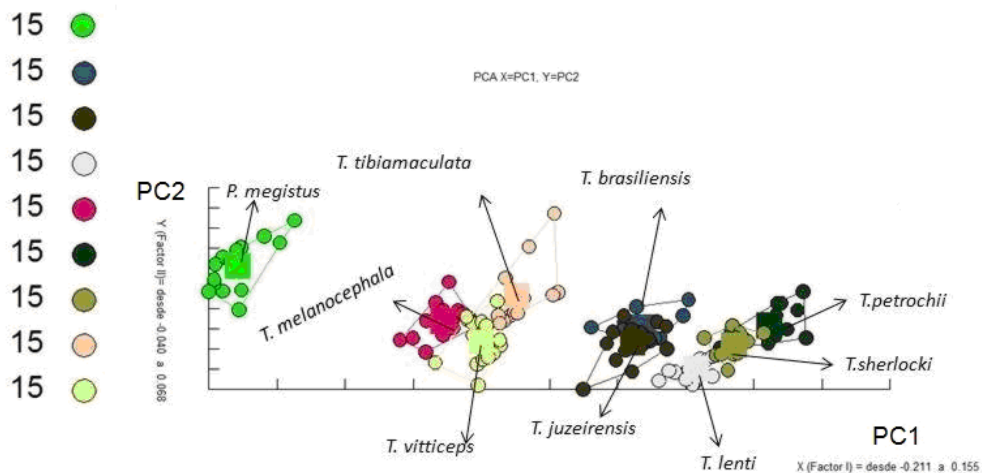


Figura 11: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em adultos macho de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

O mapa fatorial gerado a partir de componente principal 1 (CP1) e componente principal 2 (CP2) ambos influenciam nas duas variáveis (tamanho e forma) e servem de ferramenta para mostrar a distribuição de cada espécie dentro do mapa e suas similaridades, representadas pelos polígonos.

Como o CP1 recebe mais influência da forma do que do tamanho, os resultados de cabeças de adultos fêmeas e machos indicam que as distâncias entre os grupos receberam mais influência da forma.

As espécies se agruparam em polígonos bem distintos, sem resultado fora do esperado (outlines).

O componente principal 1 foi o responsável pela maior parte da diferenciação entre as espécies.

A separação apresentada entre os grupos apontados pelo mapa fatorial da análise discriminante CP1 e CP2, confirmou na árvore criada a partir das distâncias de Mahalanobis na árvore enraizada com a espécie *R. pictipes*.

A análise demonstrou que as seguintes espécies: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti* e *T. sherlocki* formaram um grupo bem definido no cladograma, bem como *P. megistus*, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* formaram um outro grupo bem definido e *T. petrochii* que saiu isolado em um terceiro grupo (Figura 11).

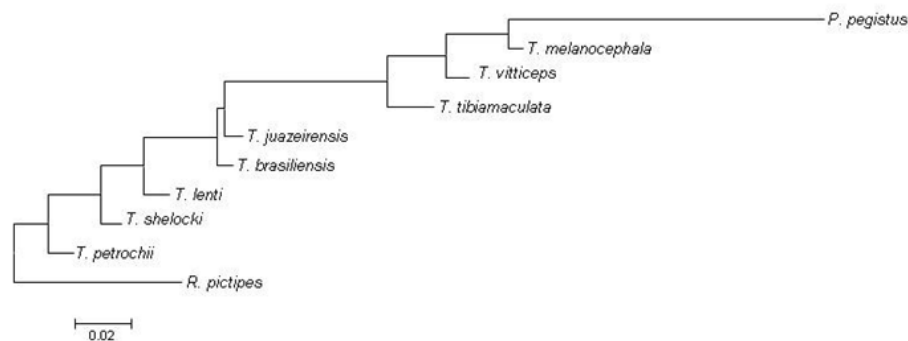


Figura 12 – Análise da distância de Mahalanobis, árvore enraizada com *R. pictipes*; para corroborar estudos filogenéticos para esse grupo.

Os resultados das análises dos componentes principais (PCA) de asas, para comparar as espécies fêmeas de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*, mostrou que o Componente Principal 1 representou 53,4% e o Componente Principal 2 representou 19%, juntos corresponderam a 72,4% da variabilidade total da forma e tamanho (Figura 12).

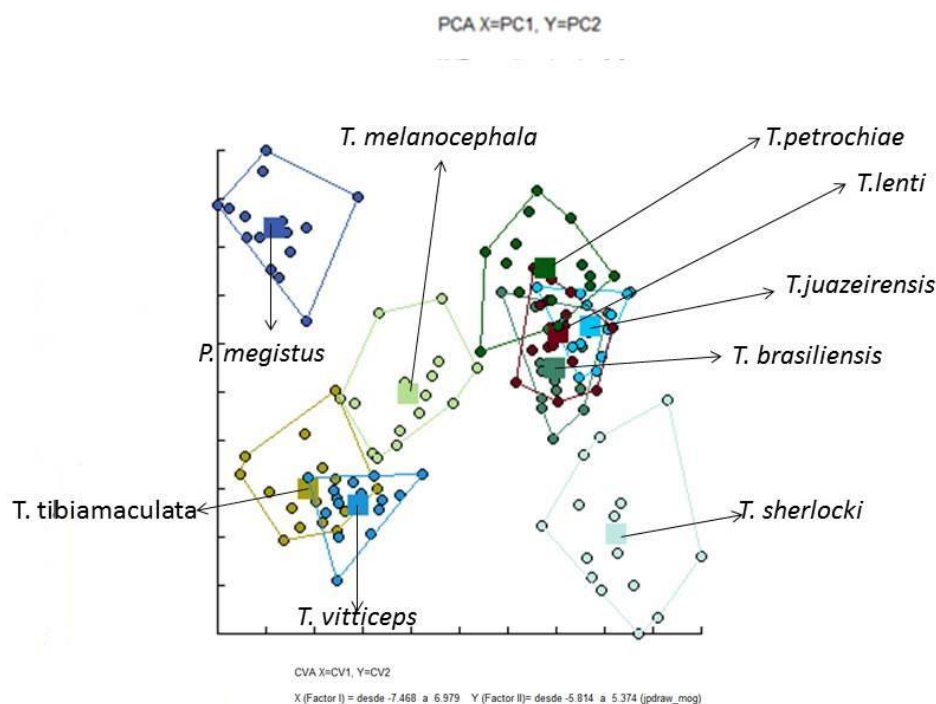


Figura 13: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em asas de adultos fêmea de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

Os resultados da análise dos componentes principais (PCA) de asas, para comparar as espécies machos de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*, mostram que o CP1 representou 46,6% e o CP2 representou 13,8 %) juntos corresponderam a 60,4% da variabilidade total da forma e tamanho (Figura 13).

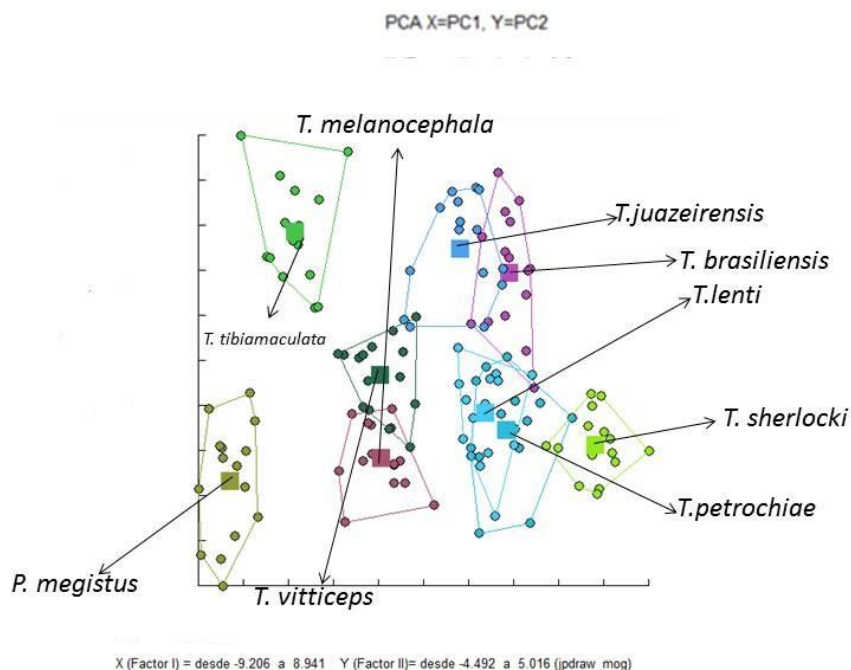


Figura 14: Mapa fatorial correspondente à ACP, detalhando o primeiro e segundo componente principal em asas de adultos macho de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus*.

O mapa fatorial gerado a partir de componente principal 1 (CP1) e componente principal 2 (CP2) ambos influenciam nas duas variáveis (tamanho e forma) e servem de ferramenta para mostrar a distribuição de cada espécie dentro do mapa e suas similaridades, representadas pelos polígonos.

Como o CP1 recebe mais influência da forma do que do tamanho, os resultados das asas de adultos fêmeas e machos indicam que as distâncias entre os grupos receberam mais influencia da forma.

As espécies se agruparam em polígonos bem distintos, sem resultado fora do esperado (outlines).

O componente principal 1 foi o responsável pela maior parte da diferenciação entre as espécies.

IV. 4 – Estudo Molecular

IV.4.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir da musculatura das pernas de 20 espécimes adultos, a integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed e observado sob a radiação ultravioleta e para a avaliar a concentração do DNA genômico utilizou se o equipamento *Thermo Scientific NanoDrop 2000* (Tabela 08).

Tabela 08 - Concentração do DNA genômico em nano gramas por microlitros.

Espécies	Quantidade (ng/ul)
<i>P. megistus</i>	606,80 ng/ul
<i>P. megistus</i>	737,70 ng/ul
<i>T. brasiliensis</i>	143,00 ng/ul
<i>T. brasiliensis</i>	338,20 ng/ul
<i>T. juazeirensis</i>	261,90 ng/ul
<i>T. juazeirensis</i>	220,30 ng/ul
<i>T. lenti</i>	276,00 ng/ul
<i>T. lenti</i>	361,40 ng/ul
<i>T. melanocephala</i>	773,60 ng/ul
<i>T. melanocephala</i>	461,90 ng/ul
<i>T. petrochii</i>	116,80 ng/ul
<i>T. petrochii</i>	780,60 ng/ul
<i>T. sherlocki</i>	173,00 ng/ul
<i>T. sherlocki</i>	224,50 ng/ul
<i>T. tibiamaculata</i>	503,60 ng/ul
<i>T. tibiamaculata</i>	499,80 ng/ul
<i>T. vitticeps</i>	597,40 ng/ul
<i>T. vitticeps</i>	450,00 ng/ul
<i>T. melanica</i>	376,30 ng/ul
<i>T. melanica</i>	359,80 ng/ul

IV.4. 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 12S apresentou cerca de 305 pares de bases (pb), 16S apresentou cerca de 546 pares de bases (pb), COI apresentou cerca de 397 pares de bases (pb), e ao Cytb 560 pares de bases (pb), o que já era esperado de acordo com os primers utilizados.

Dos genes nucleares obteve se somente a amplificação do fragmento ITS I, que apresentou uma variação 330 a 990 pares de bases, por isso não foi possível analisar essas sequências.

IV.4.3 - Sequenciamento

O DNA purificado foi processado em sequenciador automático, ABI3100, a qualidade das sequencias foi avaliada por meio de 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 (Figura 12).

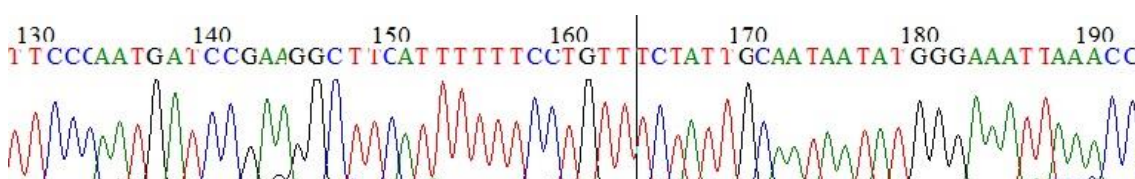


Figura 15 - Eletroferograma gerado pelo sequenciador, com picos bem definidos e que representa o padrão de qualidade das sequências do fragmento do gene COI...

IV.4.4 - Análises Filogenéticas

Um único haplótipo de cada gene foi encontrado para *T. petrochii* e para alguns genes das espécies membros do complexo *Triatoma brasiliensis* aqui descritos e sequenciados pela primeira vez. Novas sequências foram obtidas (seis para 12S, quatro para 16S, cinco para COI, e três para Cytb) e foram alinhadas com as outras disponíveis no GenBank (Tabela 2) as sequências foram cortadas de acordo com as sequências mais curtas. O alinhamento construído para a análise filogenética incluídos 299 pb para 12S (95 sítios variáveis, incluindo 42 parcimônia informativo) 256 bp de 16S (105 sítios variáveis, incluindo 44 parcimônia informativo), 202 pb do COI (126 sítios variáveis, incluindo 70 parcimônia informativo), e 202 bp de Cytb (141 sítios variáveis, incluindo 111 parcimônia informativo), totalizando 1.070 (Pb) avaliados.

Para todos os genes interespecíficos divergências entre pares (P-distâncias não corrigidos) entre *T. petrochii* e membros do complexo *Triatoma brasiliensis* foram muito maiores do que dentro deste complexo. Para a maioria dos genes variáveis, as distâncias entre *T. petrochii* e membros do complexo *Triatoma brasiliensis* variou de 1,14 (*T. petrochii* vs. *T. juazeirensis*) para 1,17 (*T. petrochii* vs. *T. sherlocki*) para o fragmento COI do mtDNA, e de 1,17 (*T. petrochii* vs. *T. brasiliensis*) a 1,12 (*T. petrochii* vs. *T. sherlocki*) para o fragmento CytB do mtDNA. Por outro lado, estas mesmas distâncias para os mesmos genes de forma variada 0,03 (*T. juazeirensis* vs. *T. melanica*) para 0,09 (*T. sherlocki* vs. *T. brasiliensis*), e 0,08 (*T. brasiliensis* vs. *T. juazeirensis*) para 0,13 (*T. sherlocki* vs. *T. brasiliensis*) dentro deste complexo.

A análise filogenética (Figura 15), com base na inferência Bayesiana recuperou *T. petrochii* como uma espécie de irmã para membros do complexo *Triatoma brasiliensis* (*T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, e *T. sherlocki*) com apoio razoável (BPP = 90). No entanto, a análise de parcimônia não podia apoiar este ramo (BP = 30).

IV.4.4.1 - Análise de Distância – Neighbor – Joining

Foram utilizados dois métodos para gerar a matriz de distância genética necessária para a construção do dendograma. O primeiro método utilizado foi o algoritmo Kimura de dois parâmetros (Kimura 2), o segundo foi o algoritmo da MCL.

Após a formação das matrizes de distância por esses dois métodos, os dendogramas foram construídos com o auxílio do Algoritmo NJ, que avalia a matriz e identifica os vizinhos mais próximos, o comprimento dos ramos representa a proporção de nucleotídeos divergentes (distância genética).

Todos esses algoritmos encontra-se no programa MEGA 6.1, os valores das ramificações são conhecidos como *Bootstrap*. Esses valores indicam o grau de confiança da estrutura da árvore. Para a construção dos dendogramas os valores de *Bootstrap* foram suportados por 1.000 replicações.

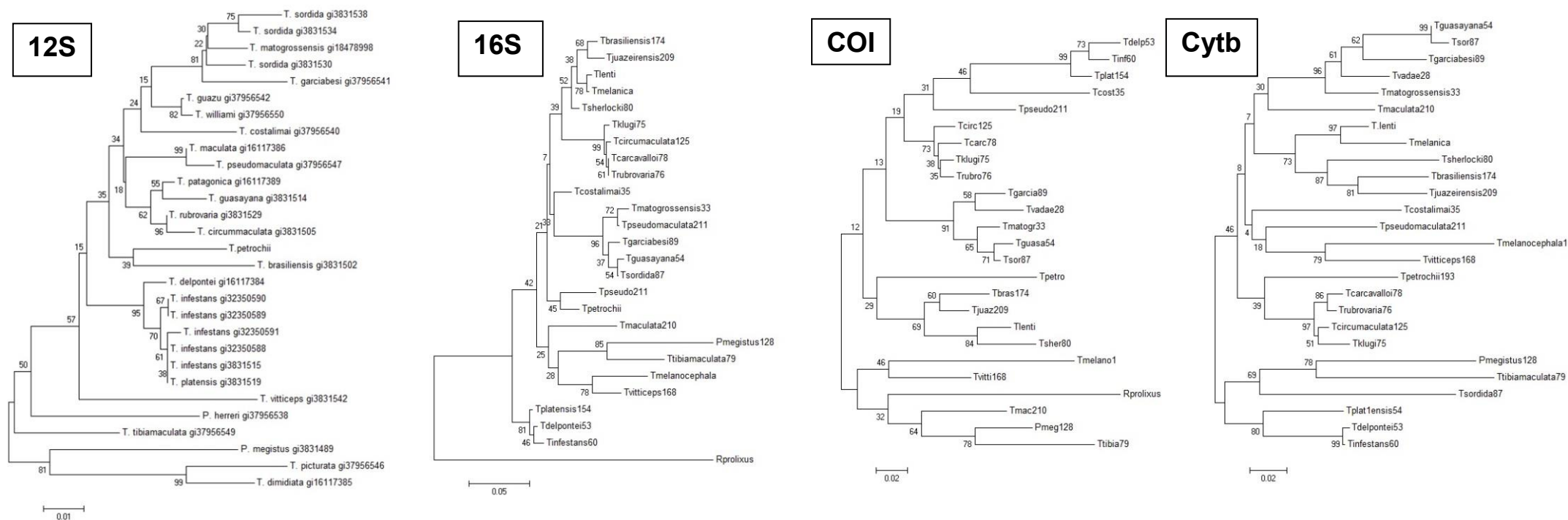


Figura 16: Dendogramas filogenéticos baseado nas sequencias da região 12S, 16S, COI e Cytb do mtDNA utilizado a análise Neighbor-Joining, com o modelo “Kimura de dois parâmetros” (Kimura2). Na legenda da figura Lê – se o nome da espécie.

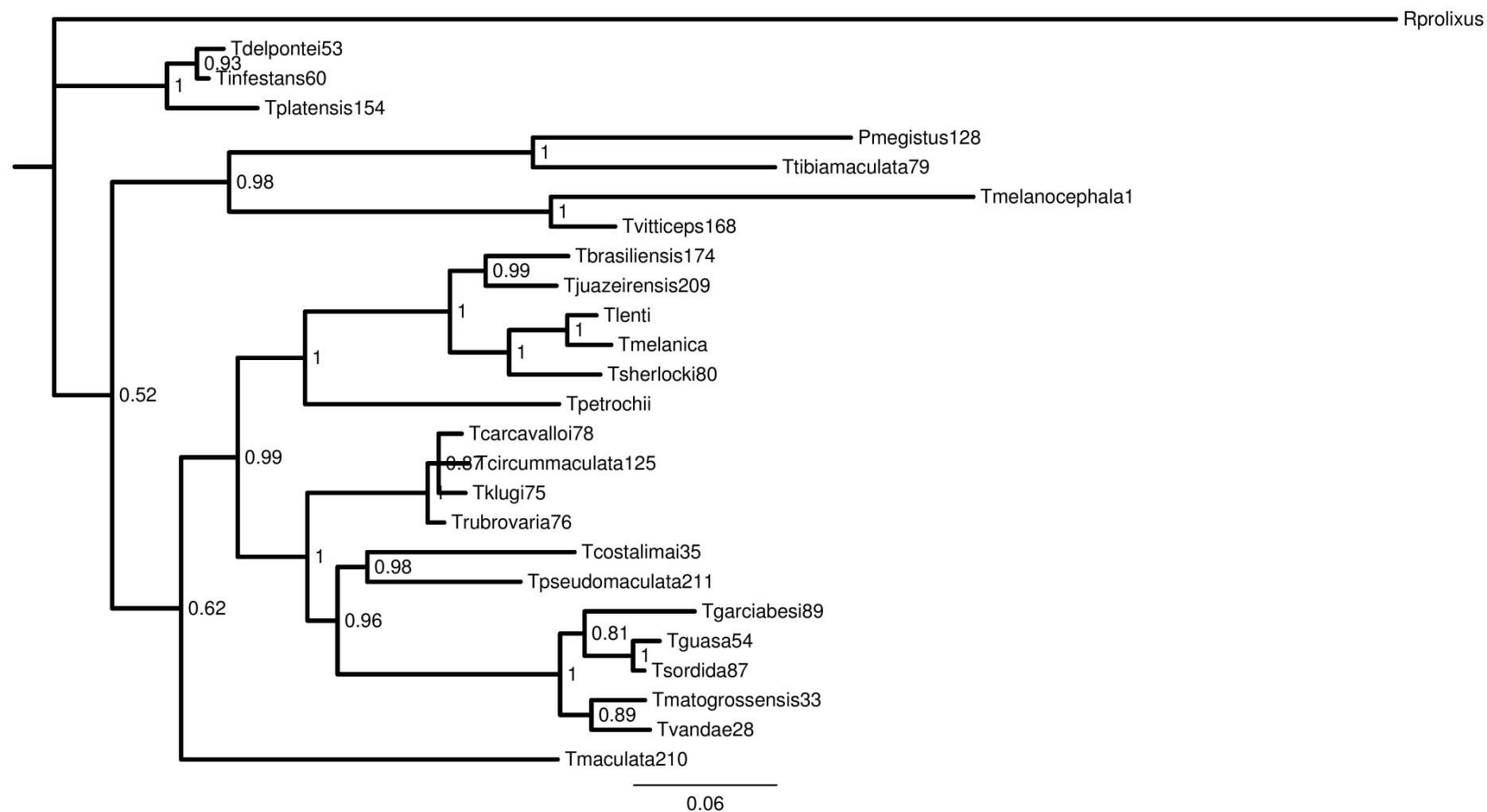


Figura 17 – Filograma da análise bayesiana com inferência da análise combinada de sequências de triatomíneos utilizados para a reconstrução filogenética. Modelos de evolução molecular para cada partição foram HKY + G para 12S e 16S rDNA; COI foi usada para HKY + I + G; e GTR + I + G para Cytb. Valores acima dos nós indicam probabilidade posterior Bayesiana (BPP).

V – Discussão

Neste trabalho optou-se por denominar complexo de espécies por gênero e espécie, em conformidade com (Usinger, Wygodzinsky e Ryckman, 1966; Ryckman e Casdin, 1976), assim, a denominação do objeto deste estudo será: complexo *Triatoma brasiliensis*. Nomenclatura essa que também foi assumida por (Costa, Argolo e Felix, 2006; Costa e Felix, 2007; Costa *et al.*, 2015). Autores como (Carcavallo *et al.*, 2001; Carcavallo *et al.*, 2002) nomearam um complexo de espécies utilizando a denominação específica com a letra inicial maiúscula (complexo Oliverai). Assim como (Alevi *et al.*, 2012) também adotaram designar um complexo de espécies pela denominação específica com primeira letra em maiúscula (subcomplexo Brasiliensis).

As espécies do complexo *T. brasiliensis* segundo (Costa, Argolo e Felix, 2006), possuem uma distribuição restrita à região Nordeste, englobando os Estados de Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Paraíba, e somente *T. melanica* pode ocorrer no Norte de Minas na divisa com a Bahia.

Os resultados obtidos quanto às mensurações do comprimento total de adultos fêmeas e machos se mantiveram dentro da media obtida por (Lent e Wygodzinsky, 1979; Costa e Felix, 2007) e foi possível observar a diferenciação no tamanho (comprimento total), que variou entre 21,05 mm e 28,01 mm para *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. petrochii*, *T. lenti*, *T. sherlocki*, ao passo que para *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* variou entre 26,45 mm e 29,94 mm.

Ao comparar os padrões de comprimento de proboscide apresentado por *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. pictipes* percebe-se que existe nítida diferença somente em *T. petrochii* que apresentou o seguinte padrão (2° segmento $> 3^{\circ} > 1^{\circ}$), e os demais apresentaram (2° segmento $> 1^{\circ} > 3^{\circ}$), sendo assim esse caracter não serviu para a diferenciação de *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata* com os demais membros do complexo *T. brasiliensis*.

A existência do dimorfismo sexual em Triatominae é bem conhecida, com as fêmeas, em média, sendo maiores que os machos e foi observado em

varios estudos (Lent e Wygodzinsky, 1979; Dujardin *et al.*, 1999; Gumiel *et al.*, 2003; Riaño, Jaramillo e Dujardin, 2009); A análise estatística das mensurações de comprimento total entre os adultos serviu para confirmar o dimorfismo sexual em *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. pictipes*.

O estudo da morfologia da genitália externa de fêmeas em triatomíneos, desconsiderado quando se tratava em identificação e taxonomia de Triatominae, foi retomado por (Rosa *et al.*, 2010) que com a utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura, verificaram diferenças taxonômicas relevantes na genitália das fêmeas que permitiram a diferenciação das espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* assim como a identificação taxonômica de 14 espécies de *Rhodnius*, cuja identificação pela morfologia geral externa gerava dúvidas (da Rosa *et al.*, 2014).

Assim, a face dorsal da genitália externa feminina mostrou que o décimo segmento e o formato do nono segmento serviram como parâmetro para separar *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki* e *T. petrochii* de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

O sétimo e oitavo segmento serviram como parâmetro para mostrar a proximidade entre *T. brasiliensis* e *T. juazeirensis* assim como entre *T. lenti* e *T. sherlocki* e possibilitaram a distinção entre *T. petrochii* e *T. melanocephala*, assim como entre *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Por meio da face posterior, as espécies estudadas podem ser distinguidas pela dimensão central do nono segmento, e pelo formato e comprimento do décimo segmento. Esses caracteres permitiram a distinção de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki* e *T. petrochii* de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Por visão ventral as espécies estudadas têm linhas distintivas no final do sétimo segmento, bem como as formas e dimensões para gonapófise e gonocoxitos. Esses caracteres serviram como parâmetro para separar *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki* e *T. petrochii* de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

(Jaramillo O, Castillo e Wolff E, 2002), demonstraram a ocorrência de mudança de tamanho, nas cabeças e asas, ao compararem *P. geniculatus* de laboratório e silvestres, porém, não conseguiram encontrar diferenças ou mudanças na “forma”, ressaltando que as mudanças de tamanho podem ter uma origem fisiológica em resposta às mudanças ambientais, e sugerindo que a mudança da “forma” dos organismos teria uma origem genética. Por isso, é importante o emprego da morfometria geométrica, na eliminação da influência ambiental na investigação das variáveis de “forma” dos organismos.

Segundo (Dujardin, Kaba e Henry, 2010) a morfometria geométrica permite visualizar mudanças de conformação indetectáveis pelos métodos morfológicos tradicionais, desse modo pode ser utilizada para a identificação de espécies. A utilização dessa técnica em estudos taxonômicos permitiu a classificação da espécie *T. melanosoma* como sinônima de *T. infestans* (Gumiel *et al.*, 2003); a diferenciação entre *T. arthurneivai* e *T. wygodzinkyi* bem como a correção na identificação de populações de *T. arthurneivai* de São Paulo para *T. wygodzinkyi* (de la Fuente *et al.*, 2011).

Diante das evidências de sucesso na utilização da morfometria geométrica na taxonomia, utilizou-se dessa metodologia para verificar a proximidade entre as seguintes espécies *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*, assim como para verificar se esta abordagem permitiria a hipótese de separação taxonômica de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* dos demais membros do complexo *Triatoma brasiliensis*.

O estudo da morfometria geométrica das cabeças mostrou diferenças significativas, tanto com relação ao tamanho como na conformação de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki*, *T. petrochii*, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps*, *P. megistus*, essa última inicialmente escolhida como grupo externo por apresentar grande diferença morfológica.

Enquanto *T. brasiliensis* é reconhecida como uma espécie capaz de colonizar domicílios, adultos de *T. petrochii* são encontrados em domicílios; no entanto ninfas colonizadoras não foram registradas nesse ambiente. A presença de ninfas dentro das casas é considerada indícios de domiciliação

(residentes), enquanto que os adultos podem ser apenas invasores (Almeida *et al.*, 2009).

No entanto, devido às semelhanças morfológicas entre essas espécies e porque não há nenhuma chave para identificar as ninfas, os registros de *T. petrocchii* em domicílios podem ser subestimados. (Sherlock e Guitton, 1967), na redescritção de *T. petrocchii* reforçaram essa suposição, mencionando que essa espécie pode ser facilmente identificada erroneamente como *T. brasiliensis* (Costa e Lorenzo, 2009).

Usando abordagens genéticas e morfológicas, sugere-se a inclusão de *T. petrocchii* no complexo de espécies *T. brasiliensis* previamente definido por (Mendonça *et al.*, 2009).

Morfológicamente *T. sherlocki* é facilmente reconhecido, por ser um braquíptero, que tem tonalidade vermelho em algumas partes das pernas (Almeida *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2013). Além disso, foi comprovado por (Almeida *et al.*, 2012) que *T. sherlocki* pode ser incapaz de voar.

Por outro lado, para a distinção de *T. petrocchii* com *T. brasiliensis* é necessário o uso de um microscópio estereoscópico e isso só é possível para os adultos. Essas espécies são distinguidas por pequenos detalhes sobre o arranjo das manchas sobre o corpo, a ausência de fóssula esponjosa nas tíbias dos machos de *T. petrocchii*, o primeiro segmento de antena mais curto do que em *T. brasiliensis*, o tamanho menor, e as cintas finas sobre os fêmures (Lent e Wygodzinsky, 1979).

Lucena, 1970 considerou *T. petrocchii* como sinônimo de *T. brasiliensis*, e ambos são frequentemente coletados no mesmo local (como as populações utilizadas neste estudo). Com o objetivo de esclarecer as dúvidas sobre a compatibilidade reprodutiva entre *T. brasiliensis* e *T. petrocchii*, Espínola, 1971 realizou cruzamento entre eles, e essas espécies não conseguiram produzir híbridos viáveis. Por outro lado, todos os membros do complexo *Triatoma brasiliensis* propostos por (Mendonça *et al.*, 2009) são capazes de cruzar livremente, em condições de laboratório (Costa *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2013).

O genoma mitocondrial evolui dez vezes mais rápido que o nuclear e quanto maior a taxa evolutiva do gene, maior a capacidade de avaliar a divergência de organismos mais próximos (Martínez *et al.*, 2006). Já o genoma

nuclear se torna interessante para avaliar organismos que divergiram há mais tempo (Abad-Franch e Monteiro, 2005).

Com o alinhamento das sequências foi possível observar e analisar os sítios homólogos e com isso, as regiões polimórficas e conservadas de cada fragmento estudado.

No alinhamento das sequências do fragmento Cytb para as espécies estudadas, pode-se observar a variação entre sítios. Nesse alinhamento podem ser observadas várias regiões polimórficas e bem distribuídas ao longo do fragmento sequenciado, esse é um fragmento que apresenta um alto grau de sítios homoplásicos. As homoplasias são o resultado de uma similaridade não homóloga, com caracteres compartilhados por algumas espécies, que não estavam presentes no ancestral comum. Isso se deve a um processo de evolução independente, o que pode fornecer uma falsa evidência em termos filogenéticos e dificultar o desenho de *primers* para a identificação de espécies como *T. petrochii* apresentou neste trabalho.

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

As análises de distância genética são realizadas com base em uma matriz de dados, que pode ser gerada a partir de vários parâmetros, assim utilizou-se o algoritmo Kimura de dois parâmetros (KIMURA 2) para gerar a matriz de distância genética necessária para a construção do filograma. Essa metodologia considera mutações do tipo transições (purina-purina ou pirimidina – pirimidina) mais prováveis de ocorrer do que as transversões (purina - pirimidina ou pirimidina – purina) (Kimura, 1980; Pinteiro *et al.*, 2005).

Os filogramas analisados, por meio da distância genética dos organismos se baseiam em calcular par a par a distância genética entre sequências, e a partir da matriz de distância, constrói a topologia e gera o filograma (Pinteiro *et al.*, 2005). As análises geradas pelo algoritmo NJ indicam

a distância genética ou porcentagem de divergência genética entre um grupo e seu ancestral comum, o que possibilita observar a formação dos clados associados relativos a um gene e assim avaliar se este gene é adequado.

A tentativa de relacionar as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*, com os membros do complexo *Triatoma brasiliensis* por meio de análises filogenéticas utilizando as sequências dos genes 12S, 16S, COI e Cytb não foi verificada. Para esse estudo também foram utilizadas sequências do genBank de 24 espécies). De maneira semelhante a definição do complexo *Triatoma brasiliensis* proposta por (Schofield e Galvão, 2009), foi recentemente questionada por estudos citogenéticos.(Alevi *et al.*, 2012; Alevi, Rosa e Oliveira, 2013; Alevi, Rosa e Azeredo-Oliveira, 2014).

Até o momento apenas *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki* foram considerados como um grupo monofilético com base na análise dos genes citocromo b (Cytb) e 16S (16S) (Monteiro *et al.*, 2003; Mendonça *et al.*, 2009).

Embora utilizando apenas análises de distância de sequências do gene 16S, (Hypsa *et al.*, 2002) apontaram a relação entre *T. tibiamaculata* e *P. megistus*, distanciando – as das espécies do complexo *Triatoma brasiliensis*.

(Gardim *et al.*, 2014) e (Justi *et al.*, 2014) estão de acordo com os autores acima citados, pois tanto *T. tibiamaculata* como as espécies recém sequenciadas *T. melanocephala* e *T. vitticeps* foram fortemente alocadas em um clado separado das demais espécies de *Triatoma* da América do Sul.

Com base na literatura consultada (Lent e Wygodzinsky, 1979) consideram que *T. brasiliensis* apresenta as subespécies: *T. brasiliensis macromelasoma* e *T. brasiliensis melanica*. (Costa, Argolo e Felix, 2006; Costa e Felix, 2007; Costa *et al.*, 2015) referem que o complexo *Triatoma brasiliensis* compreende as espécies: *T.brasiliensis brasiliensis*, *T.brasiliensis macromelassoma*, *T. juazeirensis* e *T. melanica*. (Mendonça *et al.*, 2009) acrescentam *T. sherlocki* à quatro espécies definidas por (Costa *et al.*, 2015).

(Schofield e Galvão, 2009) acrescentam as espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* ao complexo *T. brasiliensis*. Porém (Gardim *et al.*, 2014) e (Justi *et al.*, 2014) sugerem a retirada dessas três espécies do complexo *T. brasiliensis*, por meio de estudos moleculares.

Neste estudo por meio de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares sugere-se que o complexo *Triatoma brasiliensis* compreende: *T.brasiliensis brasiliensis*, *T.brasiliensis macromelassoma*, *T. juazeirensis* e *T. melanica*, *T. sherlocki*, *T. lenti* e *petrochii*. Portanto sugere-se pela primeira vez a inclusão de *T.lenti* e *T.petrochii* ao complexo *T. brasiliensis*, assim como adiciona estudos morfológicos e morfométricos que indicam a retirada de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* do referido complexo. Além disso, concatenou-se os estudos citogenéticos e moleculares que também indicam a impropriedade de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* pertencerem ao complexo *T. brasiliensis*.

VI - Conclusão

- A morfometria clássica não foi robusta o suficiente para sustentar a hipótese da separação de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki* e *T. petrochii* de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.
- O estudo da morfologia da genitália externa das fêmeas por MEV permitiu a separação de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki* e *T. petrochii* de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* evidenciando a importância desses caracteres na diagnose das espécies.
- A variação da conformação da cabeça, analisada por meio da morfometria geométrica comprova e sustenta a hipótese da separação de *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. sherlocki* e *T. petrochii* de *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.
- Apesar das semelhanças morfológicas superficiais entre *T. brasiliensis* e *T. petrochii*, eles exibiram as maiores distâncias Malanahobis e genéticos (não corrigidos p-distâncias) em comparação com os valores dentro das espécies membros do complexo *Triatoma brasiliensis*, sugerindo eventos de homoplasia para as semelhanças entre as espécies simpátricas *T. brasiliensis* e *T. petrochii*.
- A análise Bayesiana indicou *T. vitticeps* como espécie irmã de *T. melanocephala* com alto suporte (BPP=98%) e *T. tibiamaculata* como irmã de *P. megistus* (BPP=98%).
- A análise Bayesiana indicou a inclusão de *T. petrochii* e *T. lenti* no complexo *Triatoma brasiliensis* com um suporte de (BPP=99% e 98%).

- Em conclusão, pautando em aspectos morfológico morfométrico e moleculares sugerimos que o complexo *Triatoma brasiliensis* definido por (Schofield e Galvão, 2009) seja redefinido para incluir apenas *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki*, *T. petrochii*, e *T. lenti*
- Este estudo corrobora as sugestões de parafilia do gênero *Triatoma* e salienta a necessidade de uma revisão dos gêneros e espécies de triatomíneos, tendo em conta os dados filogenéticos, morfológicos e morfométricos observados.

Referências Bibliográficas

Abad-Franch, F.; Monteiro, F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77(3), n. 0001-3765, p. 17, 2005.

Aldana, E. et al. Análisis morfológico de *Panstrongylus geniculatus* de Caracas, Venezuela. **Biomedica**, v. 31, p. 9, 2011.

Alevi, K. C.; Rosa, J. A.; Azeredo-Oliveira, M. T. Cytotaxonomy of the *Brasiliensis* subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 3838, p. 583-9, 2014. ISSN 1175-5326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25081800> >.

Alevi, K. C. C. et al. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the *Brasiliensis* subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution** v. 12, n. 8, p. 2, 2012.

Alevi, K. C. C.; Rosa, J. A.; Oliveira, M. T. V. A. Mini Review: Karyotypic Survey in Triatominae Subfamily (Hemiptera, Heteroptera). **Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research**, v. 2, n. 2, p. 2, 2013.

Almeida, C. E. et al. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? **Med Vet Entomol**, v. 23, n. 4, p. 410-7, Dec 2009. ISSN 1365-2915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941607> >.

_____. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. **Acta Trop**, v. 122, n. 1, p. 71-9, Apr 2012. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210440> >.

Amato Neto, V.; J., P. **Centenário da doença de Chagas. Revista Saúde Pública** v. 43, n. 2, p. 2, 2005.

Argolo, A. M. et al. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora Ltda., Rio de Janeiro**, v. 1, p. 63, 2008.

Barata, J. M. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II – Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera – Reduviidae). **Revista. Saúde Pública** v. 15, n. 5, p. 52, 1981.

Bargues, M. D.; Mas-Coma, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18s rDNA Sequences. **Molecular Biological Evolution**, v. 14, n. 5, p. 8, 1997.

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. 14, 2000.

Carcavallo, R. U.; Jurberg, J.; Lent, H. Phylogeny of the Triatominae. A General approach. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas** v. 3, p. 44, 1999.

Carcavallo, R. U. et al. [A new species of the oliveirai complex (new designation for matogrossensis complex) from the State of Rio Grande do Sul, Brazil]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 71-9, Jan 2001. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11285477> >.

_____. [Triatoma vandae sp.n. of the oliveirai complex from the State of Mato Grosso, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 649-54, Jul 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219129> >.

Ceretti-Junior, W. et al. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de sequencias do 16S rDNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Entomologia** v. 52, n. 3, p. 8, 2008.

Chagas, C. Nova Tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 1, p. 59, 1909.

Chagas Filho, C. Meu Pai. **Casa de Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 1993.

Correia, N. et al. Cross-mating experiments detect reproductive compatibility between *Triatoma sherlocki* and other members of the *Triatoma brasiliensis* species complex. **Acta Trop**, v. 128, n. 1, p. 162-7, Oct 2013. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850508> >.

_____. Are Members of the *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) Species Complex Able to Alter the Biology and Virulence of a *Trypanosoma cruzi* Strain? **Neotrop Entomol**, v. 44, n. 2, p. 186-93, Apr 2015. ISSN 1678-8052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26013138> >.

Costa, J.; Argolo, A.; Felix, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 1385, p. 11, 2006.

Costa, J.; Felix, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 87-90, Feb 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294006> >.

Costa, J.; Lorenzo, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines--Chagas disease vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 46-51, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753457> >.

da Rosa, J. A. et al. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 17, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24405517> >.

de la Fuente, A. L. et al. Misidentification of two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. **Med Vet Entomol**, v. 25, n. 2, p. 178-83, Jun 2011. ISSN 1365-2915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039685> >.

Deane, M. P.; Lenzi, H. L.; Jansen, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 513-5, 1984 Oct-Dec 1984. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6442753> >.

Dujardin, J. et al. Changes in the sexual dimorphism of triatominae in the transition from natural to artificial habitats. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 565-9, 1999 Jul-Aug 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446020> >.

Dujardin, J. P.; Kaba, D.; Henry, A. B. The exchangeability of shape. **BMC Res Notes**, v. 3, p. 266, 2010. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20964872> >.

Espínola, H. N. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). **Rev Bras Biol**, v. 31, n. 3, p. 277-81, Sep 1971. ISSN 0034-7108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4945961> >.

Folmer, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**, v. 3, n. 5, p. 294-9, Oct 1994. ISSN 1053-6426. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881515> >.

Forattini, O. P. [Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 14(3):265-99, 1980]. **Rev Saude Publica**, v. 40, n. 6, p. 964-98, Dec 2006. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173153> >.

Galvão, C.; Angulo, V. M. *Belminus corredori*, a new species of *Bolboderini* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. **Zootaxa**, v. 1241, p. 7, 2006.

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

García, B. A.; Powell, J. R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **J Med Entomol**, v. 35, n. 3, p. 232-8, May 1998. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9615540> >.

García-Alzate, R. et al. *Triatoma maculata*, the Vector of *Trypanosoma cruzi*, in Venezuela. Phenotypic and Genotypic Variability as Potential Indicator of Vector Displacement into the Domestic Habitat. **Front Public Health**, v. 2, p. 170, 2014. ISSN 2296-2565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25325053> >.

Gardim, S. et al. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. **Infect Genet Evol**, v. 23, p. 74-9, Apr 2014. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508245> >.

Gumiel, M. et al. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosome* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). **Systematic Entomology**, v. 28, n. 2, p. 6, 2003.

Hypsa, V. et al. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol Phylogenet Evol**, v. 23, n. 3, p. 447-57, Jun 2002. ISSN 1055-7903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12099798> >.

Jaramillo O, N.; Castillo, D.; Wolff E, M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 667-73, Jul 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219133> >.

Jurberg, J. Ferramentas Usadas em Taxonomia de Triatomíneos o uso Múltiplo. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 12, 2003.

Jurberg, J.; Lent, H.; Galvão, C. Male genitalia and its importance in taxonomy. . **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Fiocruz, Rio de Janeiro., v. 1, p. 21, 1997.

Jurberg, J. et al. Atlas iconográfico dos triatomíneos do brasil (vetores da doença de chagas). . **Editora FIOCRUZ, Fiocruz, Rio de Janeiro**, v. 1, p. 1, 2014.

Justi, S. A. et al. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasit Vectors**, v. 7, p. 149, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685273> >.

Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-20, Dec 1980. ISSN 0022-2844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7463489> >.

Lehmann, P. et al. Morphometric analysis of *Triatoma dimidiata* populations (Reduviidae:Triatominae) from Mexico and Northern Guatemala. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 477-82, Aug 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16184224> >.

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. 15, 1967.

Lent, H.; Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. . **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163 n 3, p. 397, 1979.

Lucena, D. T. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. **Revista Brasileira Malariologia Doenças Tropicais**, v. 22, p. 170, 1970.

Lyman, D. F. et al. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 3, p. 377-86, Mar 1999. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466963> >.

Martínez, F. H. et al. Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. **Mol Phylogenet Evol**, v. 41, n. 2, p. 279-87, Nov 2006. ISSN 1055-7903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815044> >.

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. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 5, p. 858-64, Nov 2009. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861622> >.

Monteiro, F. A. et al. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Mol Ecol**, v. 12, n. 4, p. 997-1006, Apr 2003. ISSN 0962-1083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753218> >.

Noireau, F.; Diosque, P.; Jansen, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Vet Res**, v. 40, n. 2, p. 26, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19250627> >.

Papa, A. R. et al. *Triatoma sherlocki* sp. N. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Entomología y Vectores** v. 9, n. 1, p. 13, 2002.

Pinteiro, L. C. et al. Técnicas Algorítmicas para Construção de Árvores Filogenéticas. **Revista Científica da Faculdade Lourenço Filho**, v. 4, n. 1, 2005.

Riaño, H. C.; Jaramillo, N.; Dujardin, J. P. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 2, p. 162-8, Mar 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027882> >.

Rosa, J. A. et al. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. v.28, p. 13, 1999.

_____. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 286-92, May 2010. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512241> >.

_____. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil **ZOOTAXA**, v. 3478, n. 1175-5334, p. 62 - 76, 2012.

Ryckman, R. E.; Casdin, M. A. The triatominae of western north america, a checklist and bibliography. **Vector and Waste Management Section, California.**, v. 23, p. 18, 1976.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. . **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 1,2,3, 1989.

Schachter-Broide, J. et al. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. **J Med Entomol**, v. 41, n. 4, p. 643-9, Jul 2004. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311455> >.

Schofield, C. Biosystematics of the Triatominae. In: Service, M. W. Biosystematics of Haematophagous Insects. **Oxford, England, Clarendon Press**, p. 27, 1988.

Schofield, C. J.; Galvão, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19385053> >.

Sherlock, I. Vetores. **Brener, Z. & Andrade, Z.A., Ed. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro.** Guanabara Koogan, 1979.

Sherlock, I. A.; Guitton, N. Sobre o *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera, Reduviidae). Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais v. 17, p. 17, 1967.

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.; Wygodzinsky, P.; Ryckman, R. E. The biosystematics of Triatominae. Annu. Revista Entomology, v. 11, p. 21, 1966.

WHO, 2014 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>

Acesso as 14h00 no dia 18 de Junho de 2014.

Capitulo II – Artigos publicados



Short communication

Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini



Sueli Gardim^a, Carlos E. Almeida^a, Daniela M. Takiya^b, Jader Oliveira^a, Renato F. Araújo^c, Regina M.B. Cicarelli^a, João A. da Rosa^{a,*}

^a Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

^b Department of Zoology, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Programa de controle da Dengue em Itabuna, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2013

Received in revised form 14 January 2014

Accepted 20 January 2014

Available online 4 February 2014

Keywords:

Chagas disease

Phylogeny

Taxonomic revision

Triatominae

ABSTRACT

Multiple fragments of mitochondrial DNA genes (cytochrome *b*, cytochrome oxidase I, and 16S rDNA) were used to evaluate the phylogenetic relationships among *Triatoma melanocephala*, *Triatoma tibiamaculata*, *Triatoma vitticeps*, and other members of *Triatoma brasiliensis* subcomplex under a Bayesian framework and maximum parsimony criterion. With the addition of new sequences of *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps*, *Triatoma juazeirensis*, *Triatoma melanica* and the newly sequenced *T. melanocephala*, the three first sylvatic species, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps*, were strongly recovered into a clade separate from the other with the remaining *Triatoma* species from South America, such as the members of *T. brasiliensis* subcomplex. *Panstrongylus megistus* was recovered as a sister to *T. tibiamaculata*, whereas *T. vitticeps* was a sister to *T. melanocephala*. This study revealed the non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex, and the polyphyly of *Triatoma* was reinforced by the placement of these three sylvatic species with *Dipetalogaster*, *Meccus*, *Mepraia*, and *Panstrongylus*. The results herein shown highlight the need of generic revision in Triatomini.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Chagas disease affects 7–8 million people worldwide, mostly in Latin America, yet no vaccine has been developed. It is caused by a protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, transmitted to humans mainly by blood-sucking bugs, the triatomines. Vector transmission is still considered the main mode of infection in Brazil. Therefore, most efforts against Chagas disease focus on the interruption of its natural transmission by controlling domiciliary vector populations with pyrethroid insecticides (Vinhaes and Dias, 2000; WHO, 2013). However, the epidemiological importance of these Chagas disease vectors is continually changing. *Triatoma sherlocki*, for example, was described in 2002 as a sylvatic species, and was recently found invading and colonizing human domiciles in Bahia State (Papa et al., 2002; Almeida et al., 2012); and several

other species can be mentioned in this context (e.g., Costa, 1999; Costa and Lorenzo, 2009; Schofield and Galvão, 2009).

These changes in vector importance from an epidemiological standpoint are in part a reflection of an increase of studies on triatomine diversity, especially in Brazil. After the first reported human cases of the disease by Chagas (1909), studies on vector species reservoirs and description of new triatomine species started to increase. Currently, the subfamily Triatominae consists of 147 species and 18 genera, of which sixty-five species occur in Brazil (Galvão et al., 2003; Poinar, 2005; Costa et al., 2006; Galvão and Ângulo, 2006; Bérenger and Blanchet, 2007; Costa and Felix, 2007; Martínez et al., 2007; Sandoval et al., 2007; Jurberg et al., 2009, 2013; Rosa et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Alevi et al., 2013a). More recently, phylogenetic approaches have been used to understand evolutionary relationships among these species (Marcilla et al., 2001, 2002; Bargues et al., 2008, 2010; Costa et al., 2013; Costa and Lorenzo, 2009; Schofield and Galvão, 2009; Gurgel-Gonçalves et al., 2012; Rosa et al., 2012; Gardim et al., 2013), but most of these studies lack from good taxa or character sampling to produce a robust phylogeny. A robust phylogenetic hypothesis can be used as the basis for an informative and

* Corresponding author. Address: Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Rod. Araraquara-Jaú, Km 1, Araraquara, SP CEP 14801-902, Brazil. Tel.: +55 16 33016945; fax: +55 16 33016940.

E-mail address: joaoaristeu@gmail.com (J.A. da Rosa).

predictive classification for the group and highlight sylvatic species with potential to become epidemiologically important.

Members of *Triatoma* are grouped into complexes and subcomplexes based on morphological similarities, geographic distribution, epidemiological importance, phylogenetic relationships, and other features. At the moment, there is no consensus about the features that define complexes (Usinger et al., 1966; Lent and Wygodzinsky, 1979; Costa and Lorenzo, 2009; Rosa et al., 2012). In an attempt to consider most classifications proposed based on different rationales, Schofield and Galvão (2009) grouped together *Triatoma melanocephala*, with *Triatoma petrochiae*, *Triatoma lenti*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis*, *Triatoma melanica*, and *T. sherlocki* in the *T. brasiliensis* subcomplex of the *Triatoma infestans* complex. They also tentatively placed *Triatoma tibiamaculata* and *Triatoma vitticeps* in this group based on morphological similarities, but point out that based on 16S rDNA sequences and cytogenetics they were not found to be closely related to members of the *T. brasiliensis* subcomplex. To date, only the last four (*T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, and *T. sherlocki*) were recovered as a monophyletic group based on the analysis of the mitochondrial genes cytochrome *b* (Cytb) and 16S rDNA (16S) (Monteiro et al., 2004; Mendonça et al., 2009). Given that DNA samples for sylvatic species are difficult to be obtained, species complexes and subcomplexes definition has been chiefly based on morphological and ecological features; and for this reason, Cytb, cytochrome oxidase I (COI), and 16S sequences of mitochondrial DNA were obtained and used to evaluate the phylogenetic relationships among *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps*, and other triatomines, with focus on members of *T. brasiliensis* subcomplex.

2. Material and methods

Insects for DNA extraction were randomly obtained from colonies (CTA) maintained at the Triatominae Insectarium of the Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (Araraquara, Brazil). Details about the origin of insects can be found in Table 1. Multiple specimens were used for gene sequencing of *T. tibiamaculata* ($N=3$), *T. vitticeps* ($N=3$) and specimens of three geographic occurrence points of *T. melanocephala* distribution ($N=3$ for each), due to the reasonable geographic distance among sites (22–80 km), herein called 1, 2, and 3. In addition, we deposited new sequences for *T. juazeirensis* and *T. melanica* (COI and 16S) extracted from a single specimen for each species (see Table 2).

The species set choice for the analysis was based on (i) a broad taxon sampling representing species of different genera of Triatomini, previously recovered as related to the species of interest (members of *T. brasiliensis* subcomplex) and (ii) availability of sequences for the genes studied for these species in GenBank. Therefore, after an explorative search, not all species chosen had all three markers available for the analysis.

Total DNA extraction was performed according to the protocol described by Sambrook and Russell (Gaunt and Miles, 2002). From the extracted DNA, 16S and COI fragments were amplified as described by Mello (1982), and for Cytb as by Hypsa and collaborators (2002), and purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Life Sciences). Purified products were subjected to a sequencing reaction using BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and were analyzed in the ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Additional sequences of Cytb and 16S and COI deposited at GenBank were added to the analysis, including several representative species of South and North American species complexes and subcomplexes. *Rhodnius prolixus* were used to root the resulting phylogenies (Table 2).

Sequences were edited with BioEdit 7.0.5 and aligned with ClustalW (Larkin et al., 2007). Nucleotide data for Cytb and COI were transformed into aminoacid sequences to check the alignment. Phylogenetic analyses of concatenate 16S, Cytb, and COI sequences were run under a Bayesian framework in MrBayes 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; 2 independent runs, 4 chains, and 1 M gens) and under a maximum parsimony criterion in PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998; *hsearch*, 1000 random addition replicates with TBR branch swap, gaps treated as “?”). The following evolutionary models were chosen for the three partitions using the Akaike Information Criterion in MrModeltest (Nylander, 2004): HKY + G for 16S rDNA; GTR + I + G for Cytb; and for COI was used HKY + I + G. Clade support was estimated by Bayesian posterior probabilities (BPP) and 1,000 parsimony bootstrap pseudoreplicates (BP).

3. Results

Sixteen new sequences were obtained (five for 16S, five for Cytb, and six for COI) and aligned with others available at GenBank (Table 2) and cropped according to the shorter sequences. The alignment constructed for the phylogenetic analysis included 256 bp of 16S (95 variable sites, including 79 parsimony informative), 313 bp of Cytb (141 variable sites, including 128 parsimony informative), and 202 bp of COI (87 variable sites, including 76 parsimony informative), totalizing 771 bp evaluated. However, sequences deposited in the GenBank were much longer, with variable length.

A single haplotype for each gene was found for *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps*. Each population of *T. melanocephala* also exhibited a single haplotype for each gene. Interspecific pairwise divergences (uncorrected p-distances) between *T. melanocephala* specimens varied in 16S sequences from 0.8% (between 1 vs. 3) to 1.2% (2 vs. 3 and 1), in Cytb sequences from 0.3% (between 1 vs. 3) to 4.1% (2 vs. 1), and in COI sequences from 4.8% (between 1 vs. 2) to 10.8% (3 vs. 2). Given that 1 and 2, 2 and 3, and 1 and 3 are localities distant by 73.9 km, 80.4 km, and 22.0 km, the variation found

Table 1
Number and data of colonies studied.

Species	Number (CTA) ^a	Origin	Initiated	Coordinates
<i>T. juazeirensis</i>	207	Juazeiro - BA	01/12/2007	-9 42' 63.43637", -40 50' 31.55027"
<i>T. melanica</i>	206	Urandi - BA	29/07/2008	-14 76' 40.25299", -42 64' 99.30749"
<i>T. melanocephala</i>	221 (1) ^b	Bom Jesus da Serra - BA	26/04/2010	-14 22' 04.46160", -40 30' 52.55281"
	219 (2) ^b	Jequié - BA	08/10/2009	-13 51' 03.75834", -40 04' 52.22281"
	220 (3) ^b	Poções - BA	17/11/2009	-14 31' 01.94880", -40 22' 43.37040"
<i>T. tibiamaculata</i>	195	Mogi-Guaçu - SP	17/06/1986	-22 22' 14.51637", -46 56' 16.73298"
<i>T. vitticeps</i>	198	Guarapari - ES	01/11/1979	-20 39' 01.41478", -40 30' 25.29000"

^a CTA - Colony number registration.

^b 1, 2 and 3 - different collection spots of *T. melanocephala*.

Table 2

Accession GenBank codes of mitochondrial genes (16S, Cytb and COI fragments) of triatominae used in this study. Sequences obtained in this study are in bold. Species placements under groups recovered in the phylogenetic analysis (Fig. 1) are also given. Species marked with asterisks did not have the 3 genes deposited in the GenBank. Sequences obtained in this study are in bold.

(Sub)complex ^a	Species	Groups	16S	Cytb	COI
<i>T. brasiliensis</i>	<i>T. brasiliensis</i>	A	EU827222	FJ623064	AF021186
	<i>T. juazeirensis</i>	A	KF769453	AY494169	AF826892
	<i>T. melanica</i>	A	KF769454	AY336527	AF826891
	<i>T. melanocephala</i> 1	C	KF769452	KF826898	AF826893
	<i>T. melanocephala</i> 2	C	KF769450	KF826899	AF826894
	<i>T. melanocephala</i> 3	C	KF769451	KF826900	AF826895
	<i>T. sherlocki</i>	A	EU489057	EU489058	KC608987
	<i>T. tibiamaculata</i>	C	AY185843	KF826897	AF826890
	<i>T. vitticeps</i>	C	EU827202	KF826896	AF021219
<i>T. dimidiata</i>	<i>T. dimidiata</i>	C	AY062138	JN585910	AF301594
<i>T. infestans</i>	<i>T. delpontei</i>	D	AF324520	HQ333241	FJ439768
	<i>T. infestans</i>	D	EU143699	AY702023	AF021199
	<i>T. platensis</i> *	D	AF028744	–	AF021202
<i>T. lecticularia</i>	<i>T. rubida</i>	C	AY185842	DQ198810	DQ198800
<i>T. maculata</i>	<i>T. maculata</i>	B	EU827231	KC608977	AF449139
	<i>T. pseudomaculata</i>	B	EU827225	KC608979	KC608986
<i>T. matogrossensis</i>	<i>T. guazu</i>	B	KC571994	KC608976	KC608984
	<i>T. matogrossensis</i>	B	KC571995	KC608978	KC608985
	<i>T. vanda</i> *	B	KC571997	–	KC608989
	<i>T. williamsi</i>	B	KC571998	KC608981	KC608990
<i>T. phyllosoma</i> (=Meccus)	<i>Mec. longipennis</i> *	C	–	DQ198815	DQ198804
	<i>Mec. mazzotti</i>	C	AY035446	AY859421	DQ198805
<i>T. rubrovaria</i>	<i>T. circummaculata</i> *	B	AF021188	–	AF021191
	<i>T. rubrovaria</i>	B	AF021203	GQ398003	AF021204
<i>T. sordida</i>	<i>T. garciabesi</i> *	B	AY185835	–	EF451041
	<i>T. sordida</i>	B	KC571996	KC608980	KC608988
<i>M. spinolai</i> (=Mepraia)	<i>Mep. gajardoi</i> *	C	–	JN102359	–
	<i>Mep. spinolai</i> *	C	AY035467	JN102358	–
	<i>T. eratyrisiformis</i> *	C	AY035466	JN102360	–
Outgroups	<i>Rhodnius neglectus</i>	–	AF045704	AF045716	EU444068
	<i>Rhodnius prolixus</i>	–	AF045707	EF011726	AF449138
	<i>Dipetalogaster maximus</i> *	C	–	AF045728	–
	<i>Panstrongylus herreri</i> (=P. lignarius)*	C	AY185833	–	AF449141
	<i>Panstrongylus megistus</i>	C	AF045701	AF045722	AF021179

(–) Not available.

^a Schofield and Galvão, 2009.

in these intraspecific pairwise divergences are in accordance with geographic linear distances.

The resulting Bayesian consensus (burnin = 10%, mean of lnL of postburnin trees = –6581.46 [ESS = 1891.43]) is shown in Fig. 1, and clades also present in the strict consensus of the three most parsimonious trees (length = 1350, CI = 0.37, RI = 0.57, RC = 0.21) are shown in the same figure. Phylogenetic analyses conducted suggest the division of Triatominae in four clades, named A, B, C, and D with high support, but the present dataset does not give strong evidence concerning the relationships amongst these clades (Fig. 1). Most South American *Triatoma* were recovered in clades D (*T. infestans* subcomplex), A (*T. brasiliensis* subcomplex), and B (*T. maculata*, *T. matogrossensis*, *T. rubrovaria*, and *T. sordida* subcomplexes). However, the newly sequenced species, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, and *T. vitticeps*, were recovered with strong support within clade C (BPP = 99%), which also includes different triatomine genera (*Dipetalogaster* and *Panstrongylus*), species groupings of *Triatoma* from North America, the *T. phyllosoma* subcomplex and *T. lecticularia* complex (the former also sometimes treated as *Meccus*), and the Chilean *T. spinolai* complex (also sometimes treated as *Mepraia*). Concerning the species of interest within clade C, *T. vitticeps* was recovered as sister to populations of *T. melanocephala* with high support (BPP = 100%, BP = 98). Furthermore, Bayesian inference recovered *T. tibiamaculata* as sister to *P. megistus* with strong support (BPP = 99%). Terminals of clade C

definitely show higher pairwise divergences than the ones between terminals of species complexes in other clades.

4. Discussion

4.1. The status of the *T. brasiliensis* subcomplex

Among the triatomines, *Triatoma* includes the highest number of described species and these are subdivided into complex and subcomplexes. The definition of the *T. brasiliensis* subcomplex by Schofield and Galvão (2009) was more recently questioned by cytogenetic studies in Alevi et al. (2012a). In this study, authors proposed that *T. melanocephala* should be excluded from this subcomplex because their karyotype structure matches with species of *Panstrongylus*, *Mepraia*, *Meccus*, and other *Triatoma* species from North America. In addition, the inclusion *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps* in the *T. brasiliensis* subcomplex by Schofield and Galvão (2009) was already uncertain based on previous cytogenetic information (Panzera et al., 1998).

Based only on distance analyses of 16S sequences (parsimony analysis did not recover it), Hypsa et al. (2002) had previously found the close relationship of *T. tibiamaculata* to *P. megistus* and not to *T. brasiliensis*. More recently, Mendonça et al. (2009) sequenced fragments of Cytb and 16S to study the placement of

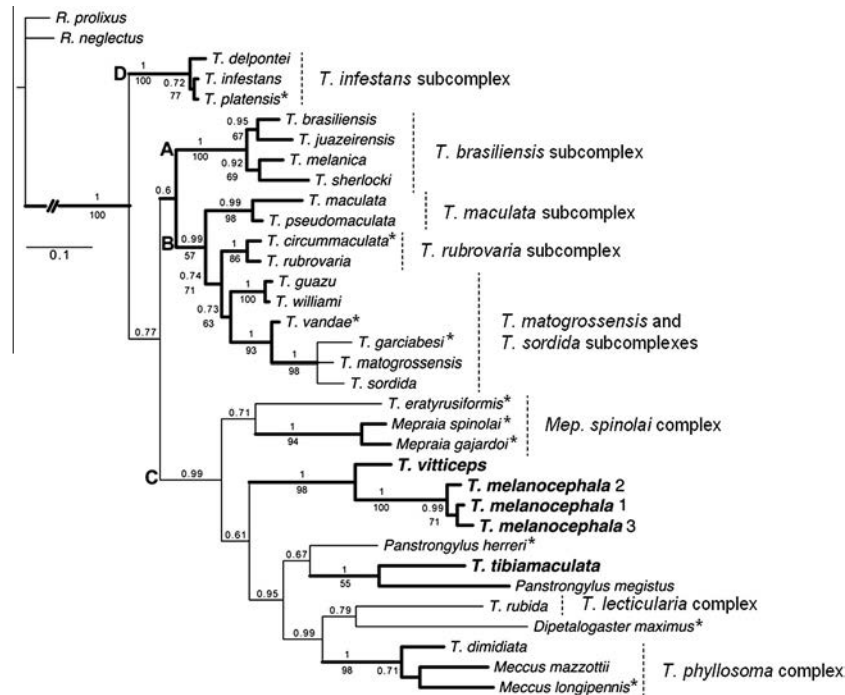


Fig. 1. Bayesian inference consensus of the combined analysis of sequences of triatomines used for the phylogenetic reconstruction. Molecular evolution models for each partition were HKY + G for 16S rDNA; GTR + I + G for Cytb; and for COI was used HKY + I + G. Thick clades represent those also recovered by parsimony analysis. Values above the clades indicate Bayesian posterior probabilities (BPP) whereas those below indicate parsimony bootstrap (PB). Species marked with asterisks did not have the three gene fragments for the analysis.

T. sherlocki in the *T. brasiliensis* subcomplex, but although the species was recovered with high clade support as related to *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* (without 16S data), and *T. melanica*, the study of only four species included in the subcomplex and usage of only a couple *Triatoma* species (*T. sordida* and *T. infestans*) as outgroups, did preclude this dataset to be good test of monophyly of this group. With the present dataset, we herein confirmed their previous suggestion.

We feel that with the inclusion of the new sequences generated herein and the addition of several species belonging to different *Triatoma* groupings, we have a more robust dataset to test this hypothesis. Our results do agree with authors above-cited since *T. tibiamaculata*, and the newly sequenced *T. melanocephala* and *T. vitticeps* were strongly recovered in a clade separate from the other clades with the remaining species of *Triatoma* from South America. Therefore the *T. brasiliensis* subcomplex, as currently defined by Schofield and Galvão (2009) was not recovered as a monophyletic unit, and should probably be redefined to include only *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki*, *T. petrochiae*, and *T. lenti*, although the position of last two species was never evaluated with evidence other than morphology (Schofield and Galvão, 2009; Lent and Wygodzinsky, 1979) and cytogenetic information (Panzeria et al., 2000; Alevi et al., 2012b; Alevi et al., 2013b). Relationships among members of *T. brasiliensis* subcomplex have been mainly tested based on biologic features. As such, cross-mating experiments have detected the reproductive compatibility among *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, and *T. sherlocki* (Costa et al., 2003; Correia et al., 2013). On the other hand, *T. petrochiae*, and *T. lenti* failed to produce hybrids with *T. brasiliensis* (Espínola, 1971; Heitzmann-Fontenelle, 1984).

Based on our evidence, we herein propose to exclude *T. tibiamaculata*, *T. melanocephala*, and *T. vitticeps* from the *T. brasiliensis* subcomplex, and that the inclusion of *T. petrochiae* and *T. lenti* should be waiting phylogenetic studies including these sylvatic species, also difficult to be collected. However, we shall not

propose a placement of these species in the triatomine classification at this moment, because we feel that to accomplish this, a future analysis should include a good sampling of non-South American *Triatoma* groupings and other triatomine genera.

4.2. Reinforcing the need for a generic revision of the Triatomini

Hypsa et al., (2002) based on the analysis of 16S sequences have previously recovered the polyphyly of *Triatoma* with respect to other triatomine genera, such as *Linshcosteus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, and *Panstrongylus* species. The polyphyly was mostly caused by the position of members of North American *Triatoma* groupings, such as the *T. phyllosoma* and *T. protracta* subcomplexes and *Meccus*, the Antillean *T. flavida* complex (sometimes treated as *Nesotriatoma*), the Chilean *Mepraia*, and the mostly Oriental *T. rubrofasciata* complex. Furthermore, as corroborated in this work with the addition of Cytb and COI sequences, the South American *T. tibiamaculata* also does contribute to this polyphyly, having been recovered as related to *Panstrongylus*. In the analyses of Hypsa and collaborators (2002), however, 16S rDNA alone was not useful in positioning *T. vitticeps*, but the parsimony analysis of combined 16S, 12S rDNA, and COI placed this species as related to the South American clade. In the present study, the inclusion of Cytb, combined with 16S and COI, groups with strong support this species to the newly sequenced *T. melanocephala*, and contrastingly places this clade together with the North America/Oriental clade. The growing accumulation of sequence data, generating more robust phylogenetic hypotheses, increasingly reinforces the need for a generic revision for the tribe. This revision should address not only the definition of species complexes and subcomplexes, but also of which species are included in other triatomine genera. In particular to this study, *Panstrongylus* was recovered as paraphyletic in relation to *T. tibiamaculata*, and this finding should be given more attention, as morphological studies should underline a possible future transfer of this species to *Panstrongylus*. Out of the 32

species included in this studied, only ten did not have sequences for all three markers (16S, Cytb, and COI). We understand that this may result in a phylogenetic signal loss, which might have been responsible in part for the low support in the placement of these species, thus these results must be interpreted with caution. Nevertheless, a separate analysis without these ten species, recovers an identical topology for the species of interest (members of the *T. brasiliensis* subcomplex) and similar associated clade support.

4.3. Eco-epidemiological implications

Triatoma vitticeps is nowadays recognized one of the potential Chagas disease vectors and, recently human cases of Chagas disease transmission has been attributed to this vector in Rio de Janeiro State throughout domiciliary colonization (Gonçalves et al., 1988; Gonçalves et al., 2000; dos Santos et al., 2005; Lorosa et al., 2008). On the other hand, *T. melanocephala* seems to remain exclusively sylvatic (Galvão et al., 2003; Gurgel-Gonçalves et al., 2012) in the Northeastern Brazil semi-arid. Nevertheless, given the close relationship found herein between these two species, we suggest continuously monitoring *T. melanocephala*.

Panstrongylus megistus has been incriminated as one of the most important Chagas disease vector in semi-arid zones of Brazil in the past (Dias et al., 2000), being eliminated from this non-native area due to a huge and costly effort of interventions of Brazilian Public Health Authorities. In fact, Dias and collaborators (2000) stated that *P. megistus* was passively carried out by humans, and that its native range was within the Atlantic Tropical Rainforest (Forattini, 1980). The close relationship between *P. megistus* and *T. tibiamaculata*, another Atlantic Forest species, may help to explain the recent finding of the latter species invading human domiciles in the downtown in Salvador, Bahia State, Brazil (Santana et al., 2011). The capacity of *P. megistus* to transmit Chagas disease and to be spread out by humans, also calls for intensifying the monitoring of *T. tibiamaculata* domiciliary invasions.

5. Conclusions

We propose the exclusion of *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, and *T. vitticeps* from the *T. brasiliensis* subcomplex. The three sylvatic Brazilian triatomines herein focused were recovered with strong support based on three mitochondrial markers (Cytb, COI, and 16S) and two different methods of tree reconstruction as closely related to other triatomine genera and *Triatoma* species with North American distribution. This study corroborates previous suggestions of polyphyly for *Triatoma* and stresses the need of a revision of the *Triatoma* and related genera taking into account phylogenetic results. Because of the epidemiological scenario of triatomine domiciliation is dynamic, we suggest attention to *T. melanocephala*, which was recovered as sister species to *T. vitticeps*, a known vector of Chagas disease.

Acknowledgements

We thank to Eliane Góes Nascimento from *Secretaria de Saúde do Estado da Bahia* for capturing the *T. melanocephala* specimens used. Financial support: Fapesp - process numbers 2010/50355-1, 2010/17027-0, and 2011/22378 and CAPES - process number 23038.005285/2011-12.

References

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Rosa, J.A., Oliveira, M.T.V.A., 2012a. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the *Brasiliensis* subcomplex? *Infect. Genet. Evol.* 12, 1652–1653.

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Succi, M., Pereira, N.P., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2012b. Karyotype of *Triatoma lenti* (Hemiptera: Triatominae), a potential Chagas vector. *Genet. Mol. Res.* 11, 4278–4284.

Alevi, K.C.C., Rosa, J.A., Azeredo Oliveira, M.T.V., 2013a. Mini review: karyotypic survey in Triatominae subfamily (Hemiptera, Heteroptera). *Entomol. Ornithol. Herpetol.* 2, 106. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0983.1000106>.

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Guerra, A.L., Facina, C.H., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2013b. Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). *Infect. Genet. Evol.* 13, 301–303.

Almeida, C.E., Oliveira, H.L., Correia, N., Dornak, L.L., Gumiel, M., Neiva, V.L., Harry, M., Mendonça, V.J., Costa, J., Galvão, C., 2012. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Trop.* 122, 71–79.

Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J.M., Monroy, C., Ponce, C., Salazar-Schettino, P.M., Panzera, F., Abad-Franch, F., Sousa, O.E., Schofield, C.J., Dujardin, J.P., Guhl, F., Mas-Coma, S., 2008. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 7, e233.

Bargues, M.D., Schofield, C.J., Dujardin, J.P., 2010. Classification and phylogeny of the Triatominae. In: Telleria, J., Tibayrenc, M. (Eds.), *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Elsevier, London, pp. 117–148.

Bérengrer, J.M., Blanchet, D., 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 733–736.

Chagas, C.R.J., 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen. n. esp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218.

Correia, N., Almeida, C.E., Lima-Neiva, V., Gumiel, L.L., Dornak, L.L., Lima, M.M., Medeiros, L.M., Mendonça, V.J., Rosa, J.A., Costa, J., 2013. Cross-mating experiments detect reproductive compatibility between *Triatoma sherlocki* and other members of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Trop.* 128, 162–167.

Costa, J., 1999. The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population, genetical, ecological, and epidemiological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 239–241.

Costa, J., Felix, M., 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 87–90.

Costa, J., Lorenzo, M., 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 46–51.

Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P., Beard, C.B., 2003. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 637–639.

Costa, J., Argolo, A., Felix, M., 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385, 47–58.

Costa, J., Correia, N.C., Lima-Neiva, V., Gonçalves, T.C.M., Felix, M., 2013. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 1–5.

Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Fernandes, A.L., Vinhaes, M.C., 2000. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad. Saude Publica* 16, 13–34.

Espínola, H.N., 1971. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). *Rev. Brasileira Biologia* 31, 278–281.

Forattini, O.P., 1980. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliary in Brazil. *Rev. Saúde Pública* 14, 265–299.

Galvão, C., Angulo, V.M., 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) form Santander, Colômbia. *Zootaxa* 1241, 61–68.

Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.S., Jurberg, J., 2003. Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202, 1–36.

Gardim, S., Rocha, C.S., Almeida, C.E., Takiya, D.M., Silva, M.T.A., Ambrósio, D.L., Cicarelli, R.M.B., Rosa, J.A., 2013. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89, 766–774.

Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol. Biol. Evol.* 19, 748–761.

Gonçalves, T.C.M., Victorio, V.M.N., Jurberg, J., Cunha, V., 1988. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). I. Ciclo evolutivo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 519–523.

Gonçalves, T.C.M., Rocha, D.S., Cunha, R.A., 2000. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Saúde Pública* 34, 348–352.

Gonçalves, T.C.M., Teves-Neves, S.C., dos Santos-Mallet, J.R., Carbajal-de-la-Fuente, A.L., Lopes, C.M., 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 429–437.

- Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J., Peterson, A.T., 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* 2012, 1–15.
- Heitzmann-Fontenelle, T.J., 1984. Bionomia comparativa de triatomíneos. VII – *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan* 48, 183–188.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Hypsa, V., Tietz, D., Zrzavy, J., Rego, R.O., Galvão, C., Jurberg, J., 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23, 447–457.
- Jurberg, J., Rocha, D.S., Galvão, C., 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton and Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotropica* 9, 123–128.
- Jurberg, J., Cunha, V., Cailleaux, S., Raigorodski, R., Lima, M.S., Rocha, D.S., Moreira, F.F.F., 2013. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. of the *T. rubrovaria* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 4, 43–56.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 1, 2947–2948.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 163, 123–520.
- Lorosa, E.S., Santos, C.M., Jurberg, J., 2008. Foco de doença de Chagas em São Fidélis, no estado do Rio de Janeiro. *Rev. Sociedade Brasileira Med. Trop.* 41, 419–420.
- Marcilla, A., Barges, M.D., Ramsey, J.M., Gastelum, E.M., Schettino, P.M.S., Abad-Franch, F., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Mas-Coma, S., 2001. 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 136–142.
- Marcilla, A., Barges, M.D., Abad-Franch, F., Panzera, F., Carcavallo, R.U., Noireau, F., Galvão, C., Jurberg, J., Miles, M.A., Dujardin, J.P., Mas-Coma, S., 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Genet. Evol.* 1, 225–235.
- Martínez, E., Chávez, T., Sossa, D., Aranda, R., Benigno, V., Vidaurre, P., 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolívia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Bol. Inst. Invest. Salud y Desarrollo* 3, 1–10.
- Mello, D.A., 1982. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Saúde Pública* 16, 282–291.
- Mendonça, V.J., Silva, M.T.A., Araujo, R.F., Junior, J.M., Junior, M.B., Almeida, C.E., Costa, J., Graminha, M.A.S., Cicarelli, R.M.B., Rosa, J.A., 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 858–864.
- Monteiro, F.A., Donnelly, M.J., Beard, C.B., Costa, J., 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 46–56.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Panzera, F., Scvortzoff, E., Perez, R., Panzera, Y., Hornos, S., Cestau, R., Nicolini, P., Delgado, V., Alvarez, F., Mazzella, M.C., Cossio, G., Martinez, M., Salvatella, R., 1998. Cytogenetics of Triatomines. In: Carcavallo, R.U. (Ed.), *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 621–664.
- Panzera, F., Pérez, R., Nicolini, P., Hornos, P., Costa, J., Borges, E., Diotaiuti, L., Scholfield, J., 2000. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera–Reduviidae–Triatominae). *Cad. Saúde Pública* 16, 83–88.
- Papa, A.R., Jurberg, J., Carcavallo, R.U., Cerqueira, R.L., Barata, J.M.S., 2002. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores* 9, 133–146.
- Poinar, J.R.G., 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a Triatomine-Trypanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 72–81.
- Rosa, J.A., Rocha, C.S., Gardim, S., Pinto, M.C., Mendonça, V.J., Ferreira Filho, J.C.R., Carvalho, E.O.C., Camargo, L.M.A., Oliveira, J., Nascimento, J.D., Cilense, M., Almeida, C.E., 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* sp.n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia Brazil. *Zootaxa* 3478, 62–76.
- Sandoval, C.M., Pabon, E., Jurberg, J., Galvão, C., 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443, 55–64.
- Santana, K.S., Bavia, M.E., Lima, A.D., Guimarães, I.C., Soares, E.S., Silva, M.M., Mendonça, J., Martin, M.S., 2011. Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. *Geospatial Health* 5, 199–203.
- Santos, C.B., Ferreira, A.L., Leite, G.R., Ferreira, G.E.M., Rodrigues, A.A.F., Falqueto, A., 2005. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 471–473.
- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110, 88–100.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., Ryckman, R.E., 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annu. Rev. Entomol.* 11, 309–330.
- Vinhaes, M.C., Dias, J.C.P., 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 16, 7–12.
- WHO, 2013. Fact sheet – Chagas disease (American trypanosomiasis). <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/n.340>> (accessed 03.05.13).