



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia**

ROSSANA FALCONE

**Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera,
Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de
marcadores mitocondriais, morfológicos e morfométricos**

Araraquara, SP

2016

ROSSANA FALCONE

Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de marcadores mitocondriais, morfológicos e morfométricos

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

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara, SP

2016.

Ficha Catalográfica

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

F182e Falcone, Rossana
Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de marcadores mitocondriais, morfológicos e Morfométricos / Rossana Falcone. – Araraquara, 2015.
81 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, área de pesquisa em Parasitologia, subárea Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. *Rhodnius*. 2. Taxonomia. 3. Citocromo b. 4. Morfologia. 5. Morfometria geométrica.
I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

"Esse é o segredo, eu acho. Você não precisa de ideias fixas sobre quem você é ou para onde você vai. Você não precisa de ofertas, notas ou carimbos de aprovação. Você só precisa estar preparado para qualquer coisa que vier." Rae (My Mad Fat Diary)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que apesar de todas as adversidades da vida nunca se deixaram abater, a vocês a minha eterna gratidão por todos os valores passados, os sacrifícios feitos e o apoio incondicional.

Agradecimentos

À Deus, pela saúde e força para superar as adversidades.

Aos meus pais, Valmir e Rosi, agradeço por todos os sacrifícios feitos em prol da minha formação pessoal e profissional. E pelo apoio que tornou possível essa conquista em minha vida acadêmica.

À minha irmã, Isabela, pelo apoio e por ser um exemplo de dedicação profissional.

À Mariana, Maria Clara e Paulo, por terem se tornado parte da minha família e sempre me apoiado.

Ao Gustavo Monnazzi, exemplo de caráter e profissionalismo, por ter despertado meu interesse pela Parasitologia e por todos os conselhos ao longo do caminho.

À Juliana Oliveira Faccio, pela amizade, incentivo e conselhos.

Ao meu orientador Dr. João Aristeu da Rosa, por ter aceitado me orientar e ter sido sempre tão presente e solícito ao longo do desenvolvimento deste trabalho. E por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.

À Aline, Dennys, Juliana e Mariana, pela amizade sincera, apoio e risadas.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia da FCFar/UNESP, por todo o apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Vagner José Mendonça, pela contribuição de grande valor durante a realização deste trabalho.

Aos participantes da banca do Exame de Qualificação, Dra. Aline Rimoldi e Dr. Marcos Obara pelas sugestões que foram de grande valia neste trabalho.

À Secretaria e Coordenação da Pós-graduação que tornam possível o desenvolvimento de nossos trabalhos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar/UNESP por ceder toda estrutura física para realização deste trabalho.

Resumo

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* no mundo, a maioria na América Latina, sendo a transmissão vetorial responsável ainda por, aproximadamente, 80% dos casos. Atualmente são descritas 151 espécies de triatomíneos agrupadas em cinco tribos formadas por 18 gêneros. O gênero *Rhodnius* conta com 19 espécies de potenciais vetores, podendo veicular *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. É considerado um dos gêneros taxonomicamente mais complexos da subfamília Triatominae, devido as semelhanças morfológicas e a distribuição geográfica que podem se sobrepor entre algumas de suas espécies dificultando seu estudo, apesar das diversas técnicas empregadas para sua distinção. Com o desenvolvimento atual das técnicas moleculares tornou-se possível a caracterização de espécies de triatomíneos por meio de marcadores mitocondriais e nucleares, tendo essa se tornado uma variável a mais para a taxonomia dos triatomíneos, assim como a já utilizada morfologia e a recentemente popularizada morfometria geométrica. A adição de novas variáveis possibilita que dados já existentes possam ser comprovados e/ou corrigidos. Neste trabalho foram obtidos subsídios que ampliam o conhecimento e que agregados aos já existentes podem proporcionar uma diferenciação mais minuciosa e precisa de espécies englobadas no gênero *Rhodnius*, de modo a contribuir para estabelecer uma classificação mais apropriada. A obtenção dos dados foi conduzida, por meio de estudo molecular, utilizando-se os marcadores mitocondriais – *citocromo b* e *citocromo oxidase I*, além de estudos morfológicos, utilizando-se como caracteres o processo mediano do pigóforo, o ângulo ânterolateral e a presença de colarinho nos ovos, a morfometria geométrica da cabeça também foi empregada, a fim de se distinguir populações de *R. neglectus* e *R. prolixus*. Os resultados obtidos a partir dessa análise multiparamétrica sugeriram que, as colônias identificadas como *Rhodnius prolixus* pertencem à espécie, que algumas colônias de *R. neglectus* analisadas apresentaram padrões condizentes com *R. prolixus*, já as demais apresentaram padrões condizentes com a espécie.

Palavras-chave: *Rhodnius*. Taxonomia. Citocromo b. Morfologia. Morfometria geométrica.

Abstract

Worldwide, it is estimated that 6 to 7 million people are infected with *Trypanosoma cruzi*, mostly in Latin America and the vector transmission is still responsible for approximately 80% of the cases. There are currently 151 described species of triatomine, grouped into five tribes, formed by 18 genres. The *Rhodnius* genre includes 19 species, which can transmit *T. cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. It is considered one of the most complex taxonomically genera of Triatominae, due to its morphological similarities and geographical distribution that may overlap among some species hindering their study, despite the various techniques used for their distinction. With the current development of molecular techniques it has become possible to characterize triatomine species through mitochondrial and nuclear markers, this became one more toll for the taxonomy of triatomines, just as the already used morphology and recently popularized geometric morphometry. The addition of new variables enables the verification and or correction of existing data. This work has generated valueable data that amplify the knowledge which in addition to the existing may provide a more accurate differentiation of species included in the genre *Rhodnius*, in order to help establish a more appropriate classification. Data collection was performed by DNA analysis, using mitochondrial markers - *cytochrome b* and *cytochrome oxidase I*, in addition to morphological parameters, as, median process of pygophore, the anterolateral angle and the presence of collar in eggs, geometric morphometry of the head was also used in order to help distinguish populations of *R. neglectus* and *R. prolixus*. The results obtained from this multiparameter analysis suggested that colonies identified as *R. prolixus* belong to the species, a few colonies of *R. neglectus* analyzed showed consistent patterns with *R. prolixus*, the others colonies of *R. neglectus* showed consistent patterns to the species originally identified.

Keywords: *Rhodnius*. Taxonomy. Cytochrome b. Morphology. Geometric morphometry.

Lista de figuras	Pág.
Figura 1. Representação do ciclo biológico da doença de Chagas (Modificado de CDC, 2015).	16
Figura 2. Distribuição de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , mundialmente, de 2006 a 2009 (Modificado de WHO, 2016).	18
Figura 3. Espécies de triatomíneos classificados segundo sua adaptação à habitações humanas (Silveira, 2000).	20
Figura 4. Distribuição de algumas das espécies do gênero <i>Rhodnius</i> na América Latina. (Reprodução parcial de Jurberg & Galvão, 2006).	22
Figura 5. Mapa parcial da distribuição de <i>R. prolixus</i> na América Central e do Sul, destacando a presença do vetor na Colômbia, Costa Rica, Nicarágua e Venezuela (Belinato, 2014).	23
Figura 6. Mapa da distribuição da espécie <i>R. neglectus</i> no Brasil (Jurberg et al., 2014)	24
Figura 7. Esquema comparativo do processo mediano do pigóforo das espécies: <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> (Modificado de Galvão, 2014).	25
Figura 8. Microfotografia da região pré-opercular de ovos de <i>R. neglectus</i> (A) e <i>R. prolixus</i> (B) evidenciando a presença ou ausência de “colarinho” (Forattini e Barata, 1974).	26
Figura 9. Pronoto, em destaque a estrutura ângulo ânterolateral (Modificado de Galvão, 2014).	26
Figura 10. Imagem retratando <i>Rhodnius neglectus</i> (A) e <i>Rhodnius prolixus</i> (B), com ângulo anterolateral em destaque (Lent e Wygodzynski, 1979).	27
Figura 11. Localização da procedência das colônias de <i>R. prolixus</i> utilizadas no estudo (Modificado de Google Earth).	30
Figura 12. Localização da procedência das colônias de <i>R. neglectus</i> utilizadas no estudo (Modificado de Google Earth).	31
Figura 13. Cabeça de <i>Rhodnius neglectus</i> retratando as 8 landmarks selecionadas para a realização da morfometria geométrica. Os pontos 1, 2, 5 e 6 são do tipo I (justaposição de tecidos) e os pontos 3, 4, 7 e 8 do tipo II (máxima curvatura).	36
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando peso molecular GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, corada com gel red. As amostras foram obtidas a partir da extração do DNAg das populações avaliadas. Sendo A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 65, F.CTA 67, G.CTA 68, H.CTA 229, I.CTA 73, J.CTA 74, K.CTA 78, L.CTA 79 e M.CTA 81.	36
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando peso molecular	37

GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, corado com gel red, evidenciando as bandas amplificadas referentes ao fragmento Cytb. Sendo A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 65, F.CTA 67, G.CTA 68, H.CTA 229, I.CTA 73, J.CTA 74, K.CTA 78, L.CTA 79 e M.CTA 81.	
Figura 16. Representação do alinhamento das sequências do fragmento do gene Cytb (700pb) obtidas no estudo e coletadas do GenBank®. Na legenda da figura o número de CTA das espécies estudadas.	38
Figura 17. Dendograma filogenético do fragmento do gene Cytb, baseado na análise <i>Neighbor-Joining</i> . Sequências referentes às CTAs estudadas com adição de sequências disponíveis no GenBank®.	39
Figura 18. Imagens captadas de ovos em aumento 50x, para avaliação da existência de “colarinho” em colônias identificadas como <i>R. neglectus</i> . É possível notar a ausência de colarinho em A (CTA 58), F (CTA 67) e G (CTA 68). E presença de colarinho em B (CTA 61), C (CTA 62), D (CTA 63), E (CTA 65) e H (CTA 229).	40
Figura 19. Imagens captadas de ovos em aumento 50x, para avaliação da existência de “colarinho” em colônias identificadas como <i>R. prolixus</i> . É possível notar a ausência de colarinho em A (CTA 73), B (CTA 74), C (CTA 78), D (CTA 79) e E (CTA 81).	40
Figura 20. Imagens captadas em aumento de 40x para avaliação do processo mediano do pigóforo das populações de interesse de <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> . Sendo <i>R. neglectus</i> : A. CTA 58, B. CTA 61, C. CTA 62, D. CTA 63, E. CTA 65, F. CTA 67, G. CTA 68 e H. CTA 229 e <i>R. prolixus</i> : I. CTA 73, J. CTA 74, K. CTA 78, L. CTA 79 e M. CTA 81.	41
Figura 21. Imagem capturada com aumento de 12,5x evidenciando o padrão dos ângulos anterolaterais das colônias estudadas de <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> . <i>R. neglectus</i> : A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 63, F.CTA 65, G.CTA 229, H.CTA 67 e I.CTA 68. <i>Rhodnius prolixus</i> : J.CTA 73, K.CTA 74, L.CTA 78, M.CTA 79 e N. CTA 81.	42
Figura 22. Mapa fatorial da análise discriminante da cabeça dos triatomíneos estudados de colônias identificadas como <i>R. neglectus</i> e <i>R. prolixus</i> .	43
Figura 23. As <i>landmarks</i> quando conectadas demonstram a existência de dois padrões de cabeça nas colônias estudadas.	43

Lista de tabelas	Pág.
Tabela 1. Colônias utilizadas, sua procedência, ponto de coleta e data de início das CTA.	30
Tabela 2. Iniciadores utilizados nas ampliações de seus respectivos genes e temperatura de anelamento utilizada.	32
Tabela 3. Códigos de acesso das sequências coletadas no Genbank® do gene mitocondrial Cytb.	37
Tabela 4. Representação dos resultados obtidos pelas diversas técnicas utilizadas, sendo que a cor azul corresponde ao padrão de <i>R. neglectus</i> e a cor vermelha de <i>R. prolixus</i>	44

Lista de abreviaturas e siglas

% - porcentagem.

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

COI – citocromo oxidase I do mtDNA.

CP1 e CP2 – Componentes principais.

CTA – Colônia de Triatominae de Araraquara.

Cytb – citocromo b do mtDNA.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

DNAg – DNA genômico.

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

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid – ácido etilendiamino tetra-acético.

F – sequência forward.

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

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

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

Kb – kilobase (1000 bases).

M – molar.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

mL – mililitro.

mM – milimolar.

mtDNA- ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

nDNA – DNA nuclear.

PCR - Polymerase Chain Reaction.

pb - pares de base.

R – sequência reverse.

rpm – Rotações por minuto.

SDS – Dodecil sulfato de sódio.

TE/TAE – solução tampão.

Tris – HCl – Tris-Ácido clorídrico.

U – unidade.

μL – microlitro

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Capítulo I – Dissertação de mestrado

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A doença de Chagas	16
1.2. Vetores	19
1.3. O gênero <i>Rhodnius</i>	20
1.4. Morfologia	24
1.4.1. Genitália masculina – Processo mediano do pigóforo	25
1.4.2. Ovos	25
1.4.3. Ângulo ânterolateral	26
1.5. Morfometria geométrica	28
1.6. Biologia molecular	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Triatomíneos	31
3.2. Estudos moleculares	32
3.2.1. Extração do DNA genômico	32
3.2.2. Iniciadores (Primers)	33
3.2.3. Amplificação dos fragmentos por PCR	34
3.2.4. Purificação e sequenciamento do DNA amplificado	35
3.3. Análise filogenética	35
3.4. Morfologia	36
3.4.1. Ovos	36
3.4.2. Processo mediano do pigóforo (genitália masculina)	36
3.4.3. Ângulo ânterolateral	36

3.5. Morfometria geométrica _____	37
4. RESULTADOS _____	38
4.1. Extração do DNA genômico _____	38
4.2. Amplificação (PCR) dos fragmentos de Citocromo B (Cytb) e Citocromo Oxidase I (COI) _____	38
4.3. Sequências _____	39
4.4. Análise filogenética _____	41
4.5. Morfologia _____	42
4.5.1. Presença ou ausência de colarinho _____	42
4.5.2. Processo mediano do pigóforo (genitália masculina) _____	43
4.5.3. Ângulo ânterolateral _____	43
4.6. Morfometria geométrica _____	44
5. DISCUSSÃO _____	47
6. CONCLUSÃO _____	50
REFERÊNCIAS _____	51

Capítulo II – Artigo

Capítulo I - Dissertação

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

Oswaldo Cruz foi incumbido do combate a um surto de malária que estava impedindo a progressão dos trabalhos de construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, prontamente designando Carlos Chagas para o trabalho clínico-profilático na ponta dos trilhos da estrada, na localidade de Lassance, MG. Em suas observações nos doentes encontrou não só sintomas de malária, mas também outros diferentes dos característicos da epidemia fazendo com que ele começasse uma investigação sobre, que culminou na descrição da doença, publicada em 1909 (LENT, 1999).

O médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas relatou a cadeia epidemiológica dessa zoonose, desde o agente etiológico ao primeiro caso humano, Berenice, primeira pessoa encontrada com a doença. Devido a esse trabalho inigualável a doença foi então nomeada em sua homenagem. A tripanossomíase é uma zoonose e está endemicamente distribuída desde o sul dos EUA à Patagonia Argentina. Seu agente etiológico é o parasito *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado (CHAGAS, 1909; YEO et al., 2005; CERETTI-JUNIOR et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; WHO, 2015).

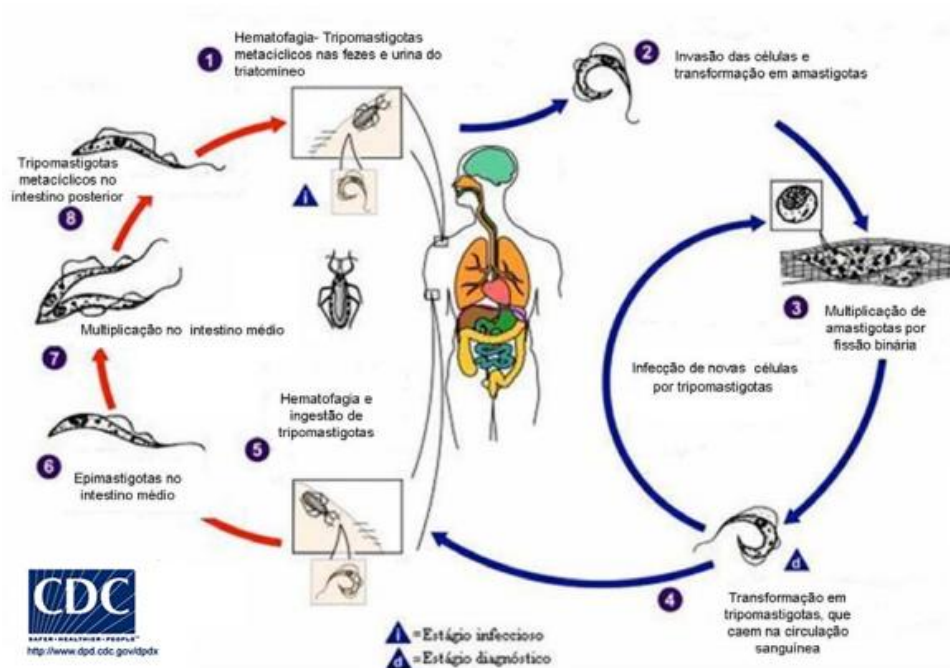


Figura 1. Representação do ciclo biológico da doença de Chagas (Modificado de CDC, 2015).

A infecção dos seres humanos ocorre prioritariamente pelo contato de sua pele lesada, ou mucosa com as fezes contaminadas do vetor, sendo a forma o tripomastigota metacíclico de *T. cruzi*, que são eliminadas durante o hematofagismo do triatomíneo. O ciclo biológico (Fig.1) tem início após a forma infectante penetrar e atingir a via sanguínea, chegando por meio dessa aos tecidos que irá infectar. Ao invadir as células o tripomastigota se transforma em amastigota (forma de multiplicação no organismo vertebrado), após se multiplicar por inúmeras vezes os amastigotas causam a lise celular, ao voltar ao espaço extracelular eles reassumem a forma de tripomastigotas, dando continuidade a multiplicação dos parasitos no organismo.

Quando um triatomíneo não infectado realiza o hematofagismo em um hospedeiro infectado pode sugar juntamente com o sangue as formas infectantes tripomastigotas. Ao adentrar o sistema digestivo do triatomíneo, mais especificamente a porção média de seu intestino, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas (forma de multiplicação no hospedeiro invertebrado) e começam a se multiplicar. Na porção final do intestino do vetor as formas epimastigotas assumem novamente a forma de tripomastigota, assim quando forem eliminadas no próximo repasto podem dar continuidade ao ciclo da doença.

A transmissão vetorial corresponde ainda à, aproximadamente, 80% dos casos da doença de Chagas (DC), a gravidade da infecção depende da idade do indivíduo infectado, condições físicas e nutricionais e está relacionada também à linhagem do parasito (ARAS et al., 2003; GARDIM, 2010; FERREIRA-FILHO et al., 2011).

A DC tornou-se um problema para a saúde humana a partir da domiciliação dos triatomíneos que, devido ao seu ecleatismo alimentar, sobrevivem com qualquer tipo de sangue, esse fenômeno proporcionou a dispersão da DC. Características próprias do vetor favorecem sua presença e prevalência no ambiente, como, por exemplo, a capacidade de colonização de diferentes ecótopos e de dispersão da espécie, o ecleatismo e preferências alimentares, capacidade e velocidade de sucção e defecção além da intensidade da fotofobia, que ainda aliadas às baixas condições sociais e ação desordenada do homem sobre o meio ambiente tornam ou não possível que uma determinada espécie seja transmissora de *T. cruzi* (BRENER et al., 2000; ARAS et al., 2003; WESTPHALEN et al., 2012).

Além da transmissão vetorial existem ainda outras vias de transmissão como a transfusão sanguínea, os acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e as via oral e congênita (ARAS et al., 2003; FERREIRA-FILHO et al., 2011). As transmissões transfusionais, por transplante e congênita ganharam destaque após o aparecimento de casos

em países onde não há relatos da existência de transmissão vetorial, como mostrado a seguir (Fig. 2)

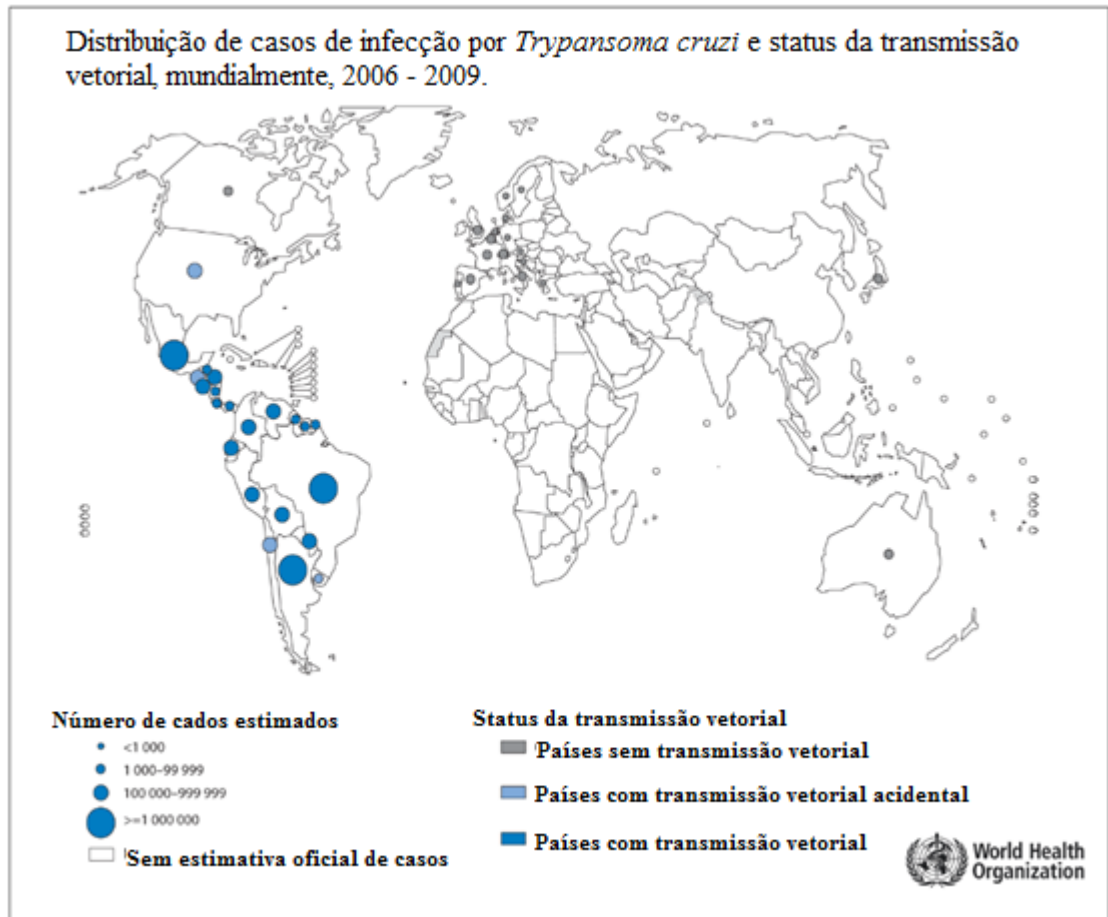


Figura 2. Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, mundialmente, de 2006 a 2009 (Modificado de WHO, 2016).

No Brasil, a transmissão oral vem chamando atenção devido ao aumento dos surtos de DC, associado principalmente ao consumo de caldo de cana-de-açúcar e açaí contaminados com o *T. cruzi*. Os Estados da Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Estados da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins) já notificaram a ocorrência em seu território de surtos de DC advindos de transmissão oral (Mendonça, 2011).

No Século XX, *Triatoma infestans* foi responsável pela grande transmissão vetorial da doença no Brasil, país que foi pioneiro no combate à endemia chagásica. Estimulou pesquisadores, dos diversos países do continente americano, a pressionar a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) a responsabilizar-se pelo combate à doença e coordenar ações para eliminar os triatomíneos das Américas (WESTPHALEN et al., 2012).

De 1994 à 2009 a incidência da transmissão de *T. cruzi*, teve uma diminuição estimada em 73% e houve uma diminuição significativa no número de parasitados na América do Sul. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, a maioria na América Latina. A queda na incidência da transmissão deve-se principalmente à adoção de medidas de combate ao inseto vetor e implantação de diagnósticos imunológicos nos bancos de sangue a partir dos anos 70 e 80 tornando legalmente obrigatória a avaliação sorológica, nos Países do Cone Sul, dos doadores previamente à transfusão (DIAS & SCHOFIELD, 1998; ABAD-FRANCH et al., 2009; YOSHIDA, 2009; SANTOS et al., 2009; WHO, 2015).

1.2 Vetores

Atualmente são descritas 151 espécies de triatomíneos agrupadas em cinco tribos formadas por 18 gêneros. Ainda que a descrição da subfamília Triatominae preconize o conceito de hematofagia obrigatória, é sabido atualmente que os triatomíneos podem se alimentar da hemolinfa de outros insetos (FORERO et al. 2004; NEVES, 2012; ROSA et al. 2012; GONÇALVES et al. 2013; GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al., 2016).

As espécies são descritas e classificadas baseando-se em critérios morfológicos que levam em consideração a coloração do conexivo e pronoto, a morfologia e morfometria dos ovos e das estruturas do corpo e a genitália do macho que permitem definir tribos, gêneros e espécies (LENT & WYGODZYNSKY, 1979).

Todas as espécies de triatomíneos são vetores potenciais de *T. cruzi*, mas apenas em alguns casos as condições para transformar a espécie em um vetor de fato, são preenchidas, condições definidas como: adaptar-se a habitações humanas, elevado grau de antropofilia, curto período de tempo entre o hematofagismo e a defecação e ampla distribuição geográfica (LENT e WYGODZINSKY, 1979).

De acordo com Gaunt e Miles (2000), os três gêneros mais importantes de triatomíneos, do ponto de vista epidemiológico, são: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*.

Silveira (2000) descreve em seu trabalho que várias categorizações têm sido feitas no sentido de melhor orientar as operações de controle do triatomíneo, sendo o mais importante o agrupamento em função da maior ou menor adaptação ao domicílio (Fig. 3), uma vez que servem à determinação da maior ou menor importância relativa de cada uma das espécies na transmissão da doença ao homem. Ele destaca ainda que mudanças ambientais, inclusive aquelas decorrentes das próprias ações de controle, podem implicar o reposicionamento de

determinada espécie, portanto qualquer classificação que se venha a fazer estará sempre sujeita a revisão.

Algumas espécies de triatomíneos segundo sua adaptação à habitação humana.	
Situação	Espécie
Espécies estritamente domiciliadas, ausentes ou raramente detectadas em ecótopos silvestres	<i>Triatoma infestans</i> <i>Triatoma rubrofasciata</i>
Espécies capturadas tanto em ecótopos silvestres como artificiais, com constituição frequente de colônias domiciliares	<i>Rhodnius prolixus</i> <i>Rhodnius pallescens</i> <i>Panstrongylus megistus</i> <i>Triatoma brasiliensis</i> <i>Triatoma dimidiata</i> <i>Triatoma maculata</i> <i>Triatoma longipennis</i> <i>Triatoma pseudomaculata</i> <i>Triatoma sórdida</i> <i>Triatoma Guasayana</i>
Espécies capturadas em domicílios, mas ainda predominantemente silvestres	<i>Triatoma rubrovaria</i> <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius nasustus</i> <i>Rhodnius neglectus</i> <i>Rhodnius pictipes</i> <i>Triatoma vitticipes</i>
Espécies silvestres, com exemplares adultos eventualmente encontrados em domicílio	<i>Triatoma protracta</i> <i>Triatoma tibiamaculata</i> <i>Triatoma melanocephala</i> <i>Triatoma pallidipennis</i> <i>Triatoma platensis</i> <i>Rhodnius robustus</i> <i>Rhodnius domesticus</i> <i>Panstrongylus geniculatus</i>
Espécies exclusivamente silvestres	<i>Alberprosenia</i> sp <i>Belminus</i> sp <i>Cavernicola</i> sp <i>Mepraia</i> sp

Figura 3. Espécies de triatomíneos classificados segundo sua adaptação à habitações humanas (adaptado de Silveira, 2000).

1.3 O gênero *Rhodnius*

Composto por 19 espécies de potenciais vetores, o gênero *Rhodnius* é considerado um dos gêneros taxonomicamente mais complexos na subfamília Triatominae. As espécies do gênero *Rhodnius* possuem padrões definidos em relação à biologia, pois a maioria das espécies é silvestre; vivem em folhagens de palmeiras, buracos de árvores, sugando sangue de aves, roedores e morcegos, depositam seus ovos aderidos ao substrato o que favorece a sua dispersão, passiva e ativa, pois muitas aves que nidificam nas palmeiras possuem hábitos migratórios.

Além das aves, os ovos podem permanecer aderidos as folhas de palmeira que são usadas pela população indígena e rural para cobertura de casas o que pode favorecer a colonização da habitação pelo inseto. Diversos estudos adotaram abordagens para definir melhor as diferentes espécies de *Rhodnius* e suas inter-relações. Como exemplo desses estudos, destaca-se o estudo de ovos, aparelho genital, a morfologia da glândula salivar, de

DNA ribossomal, biogeografia e filogenia e pela coloração homogênea tendendo sempre para castanho claro/escuro, com manchas mais ou menos acentuadas (Santos e Coimbra Jr, 1994; Jurberg et al., 2009; Santos et al., 2009; Rosa et al. 2012).

O gênero *Rhodnius* Stål segundo Carcavallo et al. (2000) é dividido em complexos: o complexo *Rhodnius pictipes* é composto por duas espécies: *R. pictipes* e *R. stali*; o complexo *Rhodnius prolixus* possui cinco espécies: *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*, *R. nasutus* e *R. domesticus*; o complexo *R. pallescens* com três espécies: *R. ecuadoriensis*, *R. colombiensis* e *R. pallescens*. E outro possível complexo é o *R. dalessandroi*, com a espécie *R. dalessandroi* e *R. milesi*. Algumas espécies não possuem os caracteres morfológicos necessários para constituir um complexo, são elas: *R. amazonicus*, *R. brethesi*, *R. neivai* e *R. paraensis* (CARCAVALLO et al., 2000).

Novas espécies que vem sendo descritas estão sendo realocadas de acordo com suas características, *Rhodnius montenegrensis*, por exemplo, possuem características para integrar o complexo *R. prolixus*, já *R. zeledoni* possui características que o agrupam a *R. paraensis*, este porém não possui características necessárias para constituir um complexo. *R. barretti*, não foi ainda alocado em nenhum complexo, assim como outras espécies (JURBERG, 2009; ROSA et al. 2012; ABAD-FRANCH et al., 2013).

As semelhanças morfológicas e a distribuição geográfica que podem se sobrepor entre algumas espécies de *Rhodnius* (Fig. 4) dificultam seu estudo, apesar de diversas técnicas empregadas para sua distinção (SOARES et al., 2000). Portanto, se faz necessário a validação de técnicas complementares para que espécies com grandes semelhanças morfológicas sejam identificadas sem maiores problemas.

<i>Rhodnius amazonicus</i> ALMEIDA, SANTOS & SPOSINA 1973	Brazil, French Guyana
<i>Rhodnius brethesi</i> MATTA 1919	Brazil, Colombia, Venezuela
<i>R. colombiensis</i> MEJIA, GALVÃO & JURBERG 1999	Colombia
<i>R. dalessandroi</i> CARCAVALLO & BARRETO 1976	Colombia
<i>R. domesticus</i> NEIVA & PINTO 1923	Brazil
<i>R. ecuadoriensis</i> LENT & LEÓN 1958	Ecuador, Peru
<i>R. milesi</i> CARCAVALLO, ROCHA, GALVÃO & JURBERG 2001	Brazil
<i>R. nasutus</i> STÅL 1859	Brazil
<i>R. neglectus</i> LENT 1954	Brazil
<i>R. neivai</i> LENT 1953	Colombia, Venezuela
<i>R. pallescens</i> BARBER 1932	Belize, Colombia, Costa Rica, Panama
<i>R. paraensis</i> SHERLOCK, GUITTON & MILES 1977	Brazil
<i>R. pictipes</i> STÅL 1872	Belize, Brazil, Colombia, Ecuador, Guyana, French Guyana, Peru, Suriname, Trinidad, Venezuela
<i>R. prolixus</i> STÅL 1859	Bolivia, Brazil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Ecuador, Guatemala, Guyana, French Guyana, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Suriname, Trinidad, Venezuela
<i>R. robustus</i> LARROUSSE 1927	Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, French Guyana, Peru, Venezuela
<i>R. stali</i> LENT, JURBERG & GALVÃO 1993	Bolivia, Brazil

Figura 4. Distribuição de algumas das espécies do gênero *Rhodnius* na América Latina. (Reprodução parcial de JURBERG & GALVÃO, 2006)

Rhodnius prolixus Stal possui papel de destaque como principal vetor da doença de Chagas em algumas áreas da América Central e Norte da América do Sul, na Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa, a espécie pode ser encontrada em dezesseis países da América Latina, além de algumas regiões da Amazônia, é possível observar sua distribuição parcial abaixo (Fig. 5) (JURBERG & GALVÃO, 2006).



Figura 5. Mapa parcial da distribuição de *R. prolixus* na América Central e do Sul, destacando a presença do vetor na Colômbia, Costa Rica, Nicarágua e Venezuela (BELINATO, 2014).

Em países como Venezuela e Colômbia, *R. prolixus* é silvestre, habitando principalmente as copas de palmeiras porém, em algumas áreas, já pode ser encontrado bem estabelecido no intradomicílio. Em partes da América Central, como Guatemala, Honduras e El Salvador, apresenta hábitos quase que exclusivamente domésticos, aumentando seu destaque no papel de vetor (SCHOFIELD, 1994; ROSA et al., 2010; ABAD-FRANCH & MONTEIRO 2007 apud DIAS, 2002).

Rhodnius neglectus Lent, 1954, é considerada uma espécie silvestre, apesar de já ter sido encontrada em habitações humanas e possuir papel secundário na transmissão da DC (ROSA et al., 2010; ROSA et al, 2014). Esta espécie está entre as que vêm ocupando nichos vagos após o controle de *Triatoma infestans* no Estado de Goiás (SANTANA, 2006). Sua primeira citação foi realizada por Lent (1954), que descreveu a espécie a partir de exemplares coletados em palmeiras do gênero *Attalea* em Minas Gerais.

Entre as espécies do gênero *Rhodnius*, *R. neglectus* é a que está mais amplamente distribuída pelo Brasil, no Distrito Federal e mais 11 estados (GO, MS, MT, BA, PI, PE, MA, TO, MG, PR e SP), como evidenciado na figura 6, sendo característica do bioma Cerrado. Não há registros de ocorrência de *R. neglectus* fora do Brasil. Em São Paulo, Minas Gerais,

Goiás, Tocantins e Paraná foram registradas invasões no peri e intradomicílio por essa espécie que tem apresentado baixos índices de infecção por *T. cruzi* (GURGEL-GONÇALVES e CUBA, 2007). No ambiente silvestre a espécie encontra-se associada a várias espécies de palmeiras como “babaçu” e “macaúba”, utilizando como fonte alimentar aves, marsupiais e roedores. Já no peridomicílio é encontrada principalmente em galinheiros (GALVÃO et al. 2003, GURGEL-GONÇALVES, 2008).

Em território paulista, no período de 1990 a 1999, foram coletados 3.149 exemplares de *R. neglectus*, sendo 2.542 no intradomicílio e 607 no peridomicílio, com índices de infecção por *T. cruzi* de 0,34% e 0,24%, respectivamente (RODRIGUES et al., 2009). Em 2009 em Araçatuba foram encontrados *R. neglectus* colonizando palmeiras e invadindo domicílios, o mesmo foi encontrado em 2012 em Monte Alto (CARVALHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014)



Figura 6. Mapa da distribuição da espécie *R. neglectus* no Brasil (Jurberg et al., 2014)

1.4 Morfologia

A identificação específica e a sistemática dos triatomíneos têm se pautado principalmente em observações morfológicas, em especial por meio de microscopia de luz. No caso de populações de morfologia próximas, quando não é possível identificar a espécie somente com os critérios morfológicos clássicos, é necessária, portanto, a utilização de outras abordagens morfológicas e moleculares como, por exemplo, o estudo das genitálias masculina e feminina, da ultraestrutura de caracteres de valor taxonômico, a análise comparativa de estruturas por morfometria geométrica e análises moleculares para identificação destas espécies (NEVES, 2012; OLIVEIRA, 2015).

1.4.1 Genitália masculina – Processo mediano do pigóforo

A genitália apresenta diversas estruturas que podem ser úteis na diferenciação de gêneros e espécies. Em 1926, Pinto observou o falo, os “ganchos” (parâmeros) e a “espinha” (processo mediano do pigóforo). Posteriormente os estudos foram ampliados para as genitálias de ambos os sexos e a partir de 1965, com os trabalhos de Lent & Jurberg as diversas estruturas fállicas das genitálias passaram a ser analisadas comparativamente mostrando que essa ferramenta pode ser útil para auxiliar na caracterização de tribos, gêneros, espécies e até mesmo de populações. Rosa et al (2010) demonstrou também a importância da genitália feminina em estudos taxonômicos, por meio de microscopia eletrônica de varredura (ROSA et al., 2010; ROSA et al., 2014; GALVÃO, 2014).

Tais parâmetros já foram adotados para a comprovação de diferenças específicas nos complexos: *Triatoma wygodzinsky* (*T. pseudomaculata* e *T. wygodzinsky*) e *Triatoma sordida* (*T. sordida* e *T. guasayana*) e no estudo de outras espécies do gênero *Triatoma* e dos gêneros *Psammolestes*, *Rhodnius*, *Paratriatoma*, *Eratyrus*, *Cavernicola* e *Panstrongylus*. A genitália masculina segundo Jurberg et al. (1997), constitui um parâmetro importante na diferenciação entre espécies do gênero *Rhodnius*, as peças que contribuem para uma melhor distinção são: o formato do falossoma, o processo mediano do pigóforo (Fig. 7), dos parâmeros e do número de processos da conjuntiva (Neves, 2012).

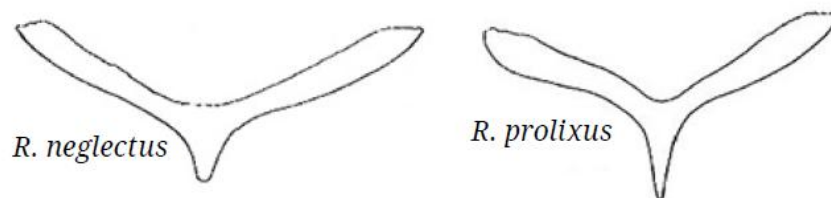


Figura 7. Esquema comparativo do processo mediano do pigóforo das espécies: *R. neglectus* e *R. prolixus* (Modificado de GALVÃO, 2014).

1.4.2 Ovos

A importância do conhecimento dos ovos dos triatomíneos foi ressaltada por Pinto em 1924 ao descrever a morfologia e a coloração dos ovos de *Triatoma brasiliensis*, conseguindo diferenciá-la de outras espécies de barbeiros existentes no Brasil. Segundo Barata (1997), diversos autores vêm se preocupando com o estudo das cascas dos ovos de insetos desde que Galliard em 1935, observou diferenças entre os exocório de diferentes espécies permitindo utilizar esse caractere para distinção entre espécies. Em 1974, Forattini e Barata descreveram

um aspecto morfológico macroscópico importante na diferenciação entre *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*, a existência de uma aglutinação próxima ao opérculo, denominada “colarinho” (Fig. 8). Barata (1981) observando as características do exocório e do opérculo dos ovos, mostrou ser possível a utilização dessas estruturas e ornamentações como caracteres de diferenciação para espécies do gênero *Rhodnius*, tendo então publicado uma chave para identificação que incluiu dez espécies (GALVÃO, 2014).

Recentemente, mais uma ferramenta foi incorporada aos estudos de ovos, a morfometria geométrica, utilizada por Páez-Colasante & Aldana (2008), por análise de imagens provenientes de MEV.

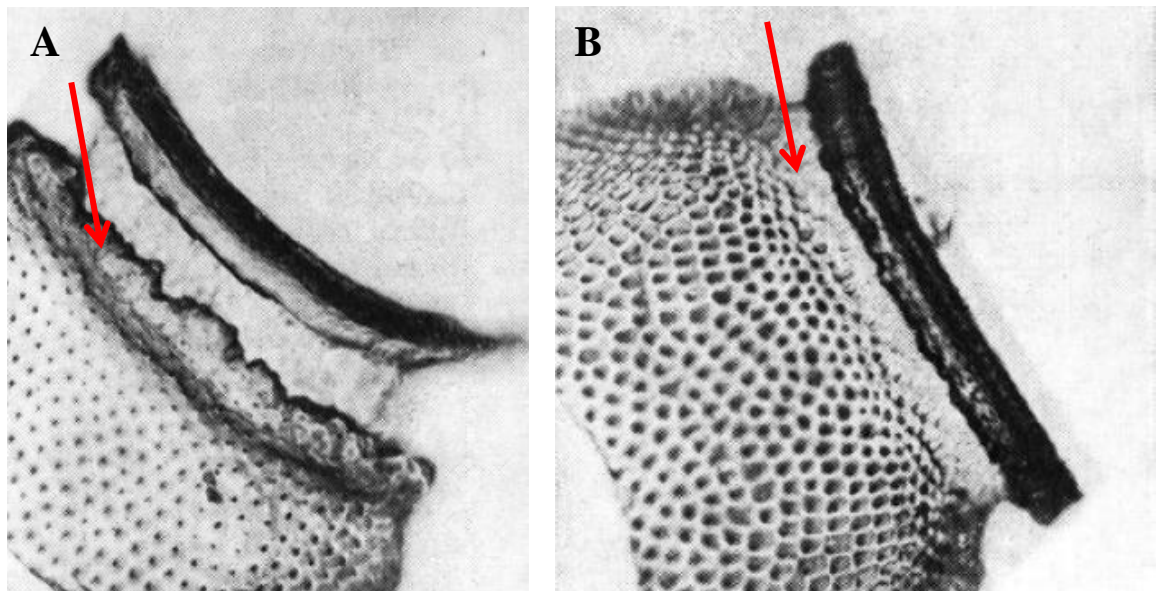


Figura 8. Microfotografia da região pré-opercular de ovos de *R. neglectus* (A) e *R. prolixus* (B) evidenciando a presença ou ausência de “colarinho” (Retirado de Forattini e Barata, 1974).

1.4.3 Ângulo ânterolateral

O pronoto (Fig. 9) dos triatomíneos é extremamente desenvolvido e dividido em dois lobos com diversas estruturas de importância taxonômica, incluindo o ângulo ânterolateral.

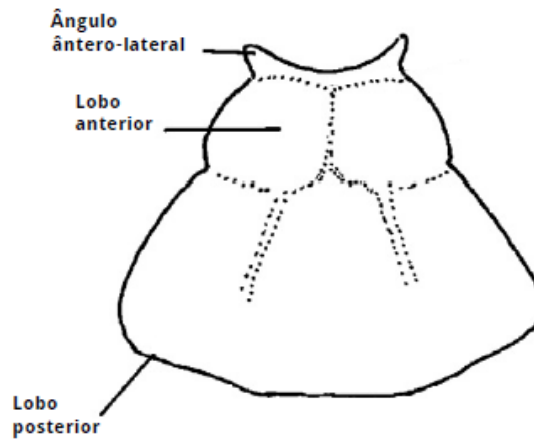


Figura 9. Pronoto, em destaque a estrutura ângulo ânterolateral (Modificado de Galvão, 2014).

Na espécie *R. neglectus* a estrutura se apresenta sendo bem proeminente, já em *R. prolixus* a estrutura possui formato arredondado e não tão proeminente (Fig. 10) (SOTO-VIVAS, 2009; GALVÃO, 2014).

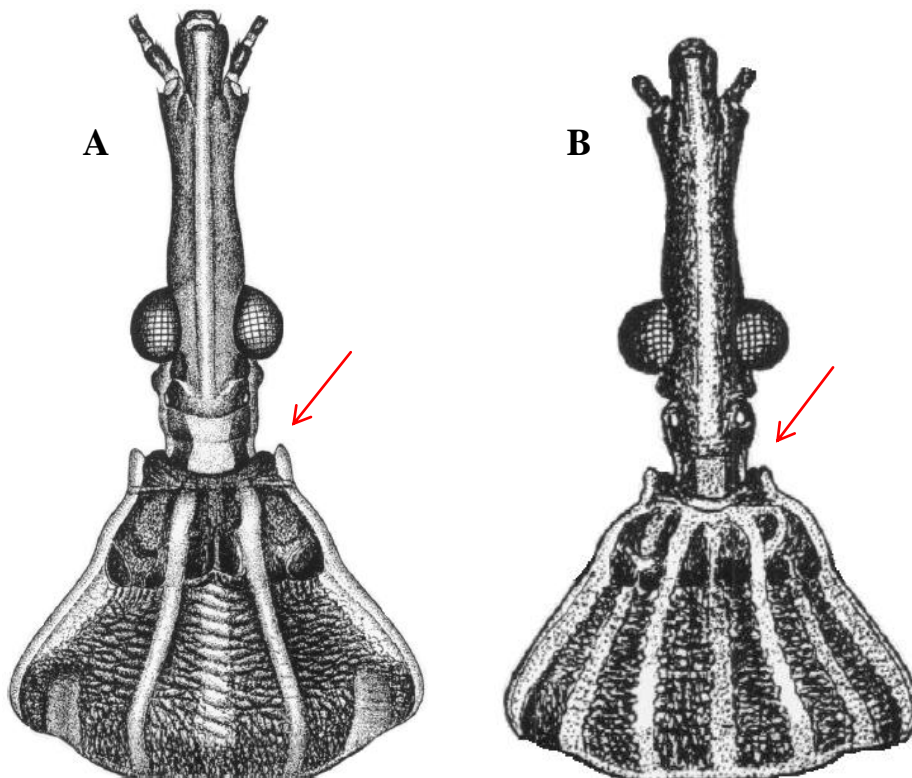


Figura 10. Imagem retratando *Rhodnius neglectus* (A) e *Rhodnius prolixus* (B), com ângulo anterolateral em destaque (LENT E WYGODZYNSKI, 1979).

1.5 Morfometria geométrica

A morfometria geométrica é um conjunto de novas técnicas no estudo da forma de estruturas biológicas em que são utilizados marcos anatômicos (*Landmarks*) ou contornos. As *landmarks* são pontos nos quais as estruturas biológicas são amostradas e que permitem identificar as variações de forma entre as mesmas estruturas morfológicas nos diferentes exemplares em estudo. A sobreposição de *Landmarks*, Análise de Distâncias de Procrustes, quantifica a variação entre formas, é um método em que se comparam formas, definidas pela configuração de *landmarks*, por meio de translação (centra a configuração de *landmarks*), rotação (rotação de todas as configurações de *landmarks* de forma a minimizar as distâncias entre elas) e escalamento (padronização da configuração de *landmarks* a partir do tamanho do centroide) (RODRIGUES & SANTOS, 2003; NEVES, 2012).

1.6 Biologia molecular

Com o desenvolvimento atual de técnicas moleculares é possível a inserção da diferenciação genética de espécies como uma variável a mais para a classificação taxonômica. O uso de marcadores moleculares para fins de análise cladística em Triatominae, auxiliam na resolução de impasses sistemáticos e dúvidas relacionadas à sua filogenia (GARDIM et al., 2013).

Esses estudos utilizam marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial (mtDNA) e no DNA nuclear (nDNA), sendo os marcadores mais utilizados do mtDNA os genes 12S, 16S, citocromo oxidase I (COI), citocromo b (Cytb) e do nDNA os genes ITS1, ITS2, 18S e a porção do domínio 2D do gene 28S. O DNA mitocondrial, herdado maternamente, não sofre recombinação e apresenta uma taxa de evolução de até dez vezes maior que o DNA nuclear, transformando-se numa excelente técnica para a separação de espécies crípticas e estudos de filogenia de triatomíneos (GARDIM, 2010; NEVES, 2012)

A identificação de espécies pertencentes ao gênero *Rhodnius* esteve desde sempre fortemente vinculada a padrões biológicos e morfológicos e às variações de ambos, a identificação de um ponto de vista geral desse gênero pode se valer sem problemas de aspectos morfológicos. Em nível de espécie a identificação, porém, pode ser uma das mais difíceis entre os triatomíneos, especialmente as espécies do complexo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*). Tal dificuldade pode acarretar uma identificação

incorreta e como consequência um prejuízo aos pesquisadores que se baseiam em dados produzidos por trabalhos com espécies erroneamente identificadas, além de prejudicar o conhecimento da distribuição das espécies, por conseguinte dificulta a orientação de ações de combate ao vetor (GURGEL-GONCALVES et al., 2008).

Com o desenvolvimento atual de técnicas moleculares é possível a inserção da diferenciação genética das espécies como uma variável a mais para a classificação taxonômica. Devido ao avanço tecnológico as metodologias morfológicas e morfométricas alcançaram um nível adequado de refinamento e precisão e por isso podem e devem ser utilizadas em complementaridade a outras técnicas.

Neste trabalho, visa-se obter dados, que agregados aos já existentes, poderão proporcionar uma diferenciação mais minuciosa e precisa das espécies englobadas no gênero *Rhodnius*, de modo a contribuir para os estudos taxonômicos e filogenéticos de Triatominae, integrando parâmetros morfológicos, de morfometria geométrica e ferramentas moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se a identificação de oito colônias de *R. neglectus* e cinco de *R. prolixus* apresentam os padrões estabelecidos na literatura para suas respectivas espécies.

2.2 Objetivos específicos

Validar marcadores mitocondriais – citocromo b e citocromo oxidase I na separação de populações de *R. neglectus* e *R. prolixus* mantidas em laboratório.

Analisar o aspecto morfológico de presença ou ausência de colarinho nos ovos de diferentes populações de *R. neglectus* e *R. prolixus*.

Analisar a morfologia da genitália masculina, com ênfase no processo mediano do pigóforo para distinção de *R. neglectus* e *R. prolixus*.

Verificar eficácia da morfometria geométrica de cabeça para separação de populações de *R. neglectus* e *R. prolixus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Triatomíneos

As colônias de *Rhodnius* utilizadas foram provenientes do Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP/Araraquara.

Foram estudadas oito populações de *R. neglectus* e cinco de *R. prolixus*, a seguir definidas:

Tabela 1 - Colônias utilizadas, sua procedência, ponto de coleta e data de início das CTA

Colônia de Triatominae de Araraquara	Espécie	Procedência	Ponto de coleta	Data
CTA 58	<i>R. neglectus</i>	Pitangueiras/SP	Macaúba (estrada)	14/06/1982
CTA 61	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	Coqueiro (fazenda)	23/05/1983
CTA 62	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	Galinheiro experimental (fazenda)	23/05/1983
CTA 63	<i>R. neglectus</i>	Jucurutu/RN	Peridomicílio (sítio)	23/05/1983
CTA 65	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	Domicílio (cidade)	05/08/1983
CTA 67	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	Galinheiro experimental (fazenda)	23/05/1983
CTA 68	<i>R. neglectus</i>	Guaira/SP	Galinheiro experimental (fazenda)	23/05/1983
CTA 229	<i>R. neglectus</i>	Formoso/GO	Cidade	27/06/2011
CTA 73	<i>R. prolixus</i>	Panamá, El Salvador e Costa Rica	SI	25/05/1983
CTA 74	<i>R. prolixus</i>	Venezuela	SI	25/05/1983
CTA 78	<i>R. prolixus</i>	Colômbia	SI	03/06/1982
CTA 79	<i>R. prolixus</i>	Venezuela	SI	05/09/1999
CTA 81	<i>R. prolixus</i>	Colômbia	SI	08/03/1982

SI: sem informação de coleta.

As localidades de origem das colônias da espécie *R. prolixus* estão assinaladas na Fig.11

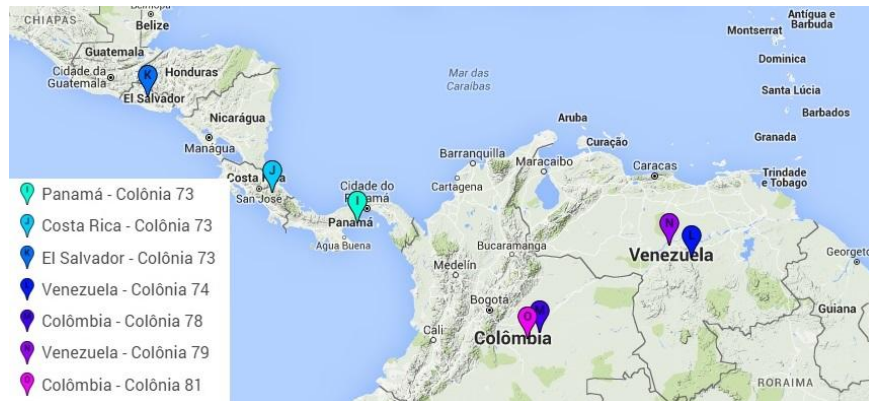


Figura 11 - Localização da procedência das colônias de *R. prolixus* utilizadas no estudo (Modificado de Google Earth)

As localidades de origem das colônias da espécie *R. neglectus* estão assinaladas na Fig. 12



Figura 12. Localização da procedência das colônias de *R. neglectus* utilizadas no estudo (Modificado de Google Earth).

3.2 Estudos moleculares

3.2.1 Extração do DNA genômico

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

Foram utilizados os três pares de pernas de cada exemplar, que foram retiradas com auxílio de pinças entomológicas e posteriormente trituradas na presença de nitrogênio líquido em microtubos de 1,5 ml. Após a trituração foi adicionado 400 μ L de solução de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0; 100mM EDTA pH 8,0; 100mM NaCl; 1% de SDS a 10%), em seguida foi adicionado 20 μ L de proteinase K (500mg/mL) e os microtubos foram vortexados e incubados a 40°C *overnight*. Retirados os microtubos do banho adicionou-se 500 μ L fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) cada, a seguir foram vortexados e realizou-se centrifugação por 3 minutos a 14000rpm, transferindo a fase superior para um novo microtubo. No novo microtubo contendo a fase aquosa foi adicionado 2 μ L de RNase (10 μ g/100mL), o tubo foi vortexado e incubado em banho-maria a 55°C por uma hora. Foi então adicionado 400 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido por centrifugação de 3 minutos a 14000rpm a 4°C. O sobrenadante foi novamente transferido a um novo microtubo onde foi adicionado 400 μ L fenol:álcool isoamílico (24:01) e centrifugado por 3 minutos a 14000rpm a 4°C. A fase aquosa foi novamente passada a outro microtubo, onde foi acrescido 40 μ L de acetato de amônio 4M e mais 1mL de etanol absoluto gelado e novamente centrifugado por 10 minutos a 14000rpm e 4°C. A fase aquosa foi toda descartada e o *pellet* resuspendido em 400 μ L de etanol 70% gelado e uma nova centrifugação de 10 minutos, a 14000rpm e 4°C foi realizada. Após a retirada de todo líquido a amostra foi deixada para secar, *overnight*, em temperatura ambiente. O DNA precipitado foi resuspenso em água Milli-Q autoclavada e armazenada em freezer.

3.2.2 Iniciadores (*primers*)

Os iniciadores utilizados nas ampliações do gene *Citocromo b (Cytb)*, foram descritos por Monteiro et al., 2003 e nas ampliações do gene *Citocromo Oxidase I (COI)* aqueles descritos por Folmer et al., 1994, ambos genes do DNA mitocondrial.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nas ampliações de seus respectivos genes e temperatura de anelamento utilizada

Gene	Sequência do iniciador	Temperatura de anelamento
<i>Cytb</i>	<i>Forward</i> (F): 5'– GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC – 3'	45°C
	<i>Reverse</i> (R): 5'– GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA – 3'	45°C
Gene	Sequência do iniciador	Temperatura de anelamento
<i>COI</i>	F: 5'– GGTCACAAATCATAAAGATATTGG – 3'	42°C
	R: 5'– TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA – 3'	42°C

3.2.3 Amplificação dos fragmentos por PCR:

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas em termociclador *BIO-RAD T100 Thermal Cycler*.

Para realização da técnica de PCR foi seguido protocolo indicado pela *Thermo Scientific* para a enzima *High Fidelity PCR Enzyme Mix*, incluindo temperaturas e concentrações.

Para cada amostra foi utilizado 1µL de cada primer, *forward* e *reverse* (concentração de 10 picomoles), 1µL de dNTP (10µL de dATP, 10µL dCTP, 10µL dGTP, 10µL dTTP e 60µL de água Milli-Q autoclavada), 0,3µL de enzima (1,25 U), 6µL de cloreto de magnésio e 5µL de solução tampão (respectivos a enzima). Utilizou-se também 3µL de DNAg e água deionizada e autoclavada para completar o volume de 50µL. O fragmento obtido foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 1,0%. O produto da reação foi armazenado em freezer.

Para a amplificação do gene *Cytb* utilizou-se o seguinte protocolo:

- cinco minutos a 94°C (desnaturação inicial)
 - um minuto a 94°C (desnaturação)
 - um minuto e meio a 45°C (anelamento)
 - um minuto e meio a 72°C (extensão)
 - dez minutos a 72°C (extensão final)
- } 35 ciclos

Para a amplificação do gene *COI* utilizou-se o seguinte protocolo:

- três minutos a 94°C (desnaturação inicial)
 - um minuto a 94°C (desnaturação)
 - um minuto e meio a 42°C (anelamento)
 - dois minutos a 72°C (extensão)
 - dez minutos a 72°C (extensão final)
- } 35 ciclos

3.2.4 Purificação e sequenciamento 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, para seu posterior sequenciamento.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi processado pelo Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, por meio de sequenciadores da *Applied (Life Technologies)* ABI3100 e ABI3730XL, que utilizam o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*.

3.3 Análise filogenética

Observou-se os eletroferogramas atentando-se para existência de picos bem definidos. A edição se baseou na análise e junção das sequências F e R, após alinhamento com ClustalW multiple alignment, ferramentas disponíveis no programa BioEdit versão 7.2.5.

As sequências foram analisadas e posteriormente ajustadas manualmente. Para as colônias que possuíam amostras em triplicata foi gerado um *consensus* e em seguida a análise filogenética foi realizada com auxílio do programa Mega 6.0, utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining*, que gera dendogramas com base na distância genética dos organismos estudados, o comprimento dos ramos representa a proporção de nucleotídeos divergentes. A adição do teste filogenético *Bootstrap* com 1000 replicações, considerando valores acima de 75% bem suportados (GARDIM, 2010; GURGEL- GONÇALVES, 2008).

3.4 Morfologia

3.4.1 Ovos

O aspecto macroscópico utilizado neste trabalho foi a presença ou não de uma aglutinação próxima ao opérculo dos ovos, denominada “colarinho” descrito por Forattini e Barata (1974), considerado um caractere que diferencia *R. neglectus* de *R. prolixus*. Foram utilizados 30 ovos de cada colônia e as imagens capturadas em microscópio estereoscópico Leica MZ APO com aumento de 50x por meio do programa Novo Captura 2.0 e foi então observado a presença ou ausência de “colarinho”.

3.4.2 Processo mediano do pigóforo (Genitália masculina)

Para a montagem da peça anatômica (pigóforo) houve adaptação de um protocolo abordado por Eunice Galatti em 2015 na disciplina de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Primeiramente foi separado um macho de cada colônia e retirado a genitália, essa foi então colocada em um cadinho de porcelana na presença de hidróxido de potássio 10% durante 24 horas, após as peças foram separadas em parâmeros, falo e processo mediano do pigóforo, e retornadas ao recipiente por mais 12 horas para clarificação. Realizou-se o processo de desidratação alcoólica onde as peças foram colocadas por 10 minutos em álcool 70%, 90%, 95% e absoluto e secas à temperatura ambiente.

Já secas, as peças foram imersas em Eugenol por 3 horas e depois montadas entre lâmina e lamínula na presença de balsamo do Canadá. O tempo de secagem das lâminas em temperatura ambiente foi de aproximadamente cinco dias.

3.4.3 Ângulo anterolateral

Para a análise dos ângulos anterolaterais, estruturas localizadas na borda do pronoto dos triatomíneos, foram coletadas imagens de 10 exemplares de cada colônia estudada, utilizando-se microscópio estereoscópico Leica MZ APO com aumento de 20x por meio do programa Novo Captura 2.0 e foi então observado a forma do ângulo anterolateral. Na espécie *R. neglectus* a estrutura se apresenta sendo bem proeminente (Galvão, 2014). Já segundo

Soto-Vivas (2009) a espécie *R. prolixus* apresenta a estrutura em formato arredondado e não tão proeminente quanto *R. neglectus*.

3.5. Morfometria geométrica

Para análise da morfometria geométrica foram coletadas imagens da cabeça de 15 exemplares por meio de microscópio estereoscópico Leica MZ APO com aumento de 20x por meio do programa Novo Captura 2.0. Utilizando o programa CLIC 98 foram aplicadas em cada imagem 8 marcros anatômicos (*landmarks*) selecionados a partir do trabalho de Gurgel Gonçalves (2008), sendo 4 deles do tipo I (justaposição de tecidos) e 4 do tipo II (ponto de máxima curvatura) (Fig. 13). A análise das coordenadas coletadas foi realizada também por meio do programa CLIC 98, por meio de um método ortogonal de projeções chamado “Procrustes”, a fim de ajustar as figuras sobre um ponto comum, o tamanho centroide, por meio de movimentos de translação, escalamento e rotação.

A análise discriminante foi realizada utilizando os principais componentes do “Procrustes”, a partir dos componentes principais obtidos nessa análise foi construído um mapa fatorial com os dois primeiros componentes principais (“eigenvalues”, CP1 e CP2) para observar a existência de diferença entre *R. neglectus* e *R. prolixus*.

Foi calculado para cada espécime 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.

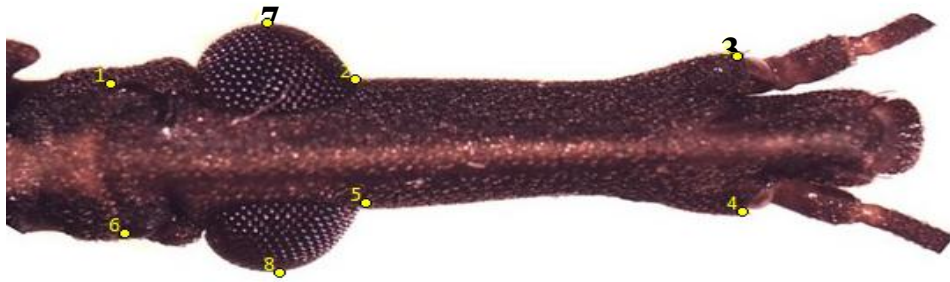


Figura 13 - Cabeça de *Rhodnius neglectus* retratando as 8 *landmarks* selecionadas para a realização da morfometria geométrica. Os pontos 1, 2, 5 e 6 são do tipo I (justaposição de tecidos) e os pontos 3, 4, 7 e 8 do tipo II (máxima curvatura).

4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA genômico

Para que fosse possível verificar a relação filogenética entre as duas espécies estudadas, foi extraído o DNA genômico, o passo inicial para a realização da investigação, foi observar a existência de bandas referentes aos espécimes das colônias estudadas, com aproximadamente 10.000 pb, que confirmam positivamente o resultado da extração (Fig 14).

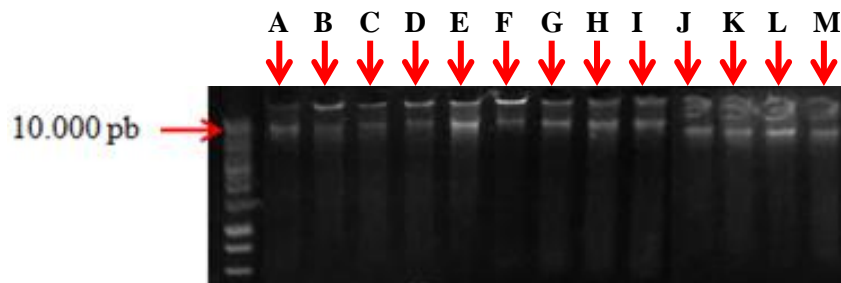


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando peso molecular GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, corada com gel red. As amostras foram obtidas a partir da extração do DNAg das populações avaliadas. Sendo *R. neglectus*: A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 65, F.CTA 67, G.CTA 68, H.CTA 229 e *R. prolixus*: I.CTA 73, J.CTA 74, K.CTA 78, L.CTA 79 e M.CTA 81.

4.2 Amplificação (PCR) dos fragmentos do gene *Citocromo B(Cytb)* e *Citocromo Oxidase I (COI)*

Utilizando metodologia já descrita, a amplificação dos fragmentos do gene *Cytb* foram avaliados em gel de agarose 1,0%, para a confirmação do tamanho dos pares de base, aproximadamente 700 pb, que podem ser observadas na figura abaixo (Fig. 15), com formação de bandas na faixa de peso molecular correspondente a 700p.

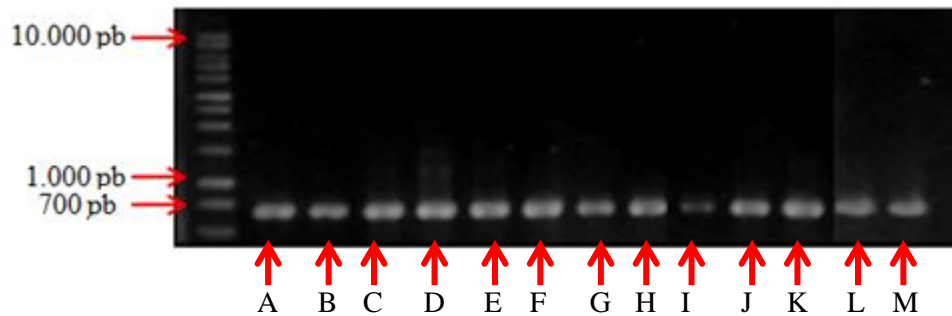


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando peso molecular GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, corado com gel red, evidenciando as bandas amplificadas referentes ao fragmento Cytb. Sendo *R. neglectus*: A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 65, F.CTA 67, G.CTA 68, H.CTA 229 e *R. prolixus*: I.CTA 73, J.CTA 74, K.CTA 78, L.CTA 79 e M.CTA 81.

Não obtivemos sucesso quanto à amplificação do gene COI para as espécies *R. neglectus* e *R. prolixus*. Muito provavelmente devido ao *primer* utilizado não ter sido especificamente desenhado para o gênero, apesar de haver casos de sucesso na utilização de *primer* para muitas espécies, é sabido que este continua um desafio quando se trata do gênero *Rhodnius*.

4.3 Sequências:

As sequências do gene Cytb foram manualmente ajustadas, quando houve a possibilidade foi realizado o consensus das amostras em triplicata. A seguir foi realizada a junção de todas as sequências prontas com sequências selecionadas e coletadas do GenBank® e em seguida alinhadas (Fig. 16).

Tabela 3 - Códigos de acesso das sequências coletadas no Genbank® do gene mitocondrial Cytb

Espécie	Código de acesso
<i>Rhodnius neglectus</i>	AF045716
<i>Rhodnius prolixus</i>	AF421339
<i>Rhodnius prolixus</i>	EU363822
<i>Rhodnius pictipes</i>	JX273157

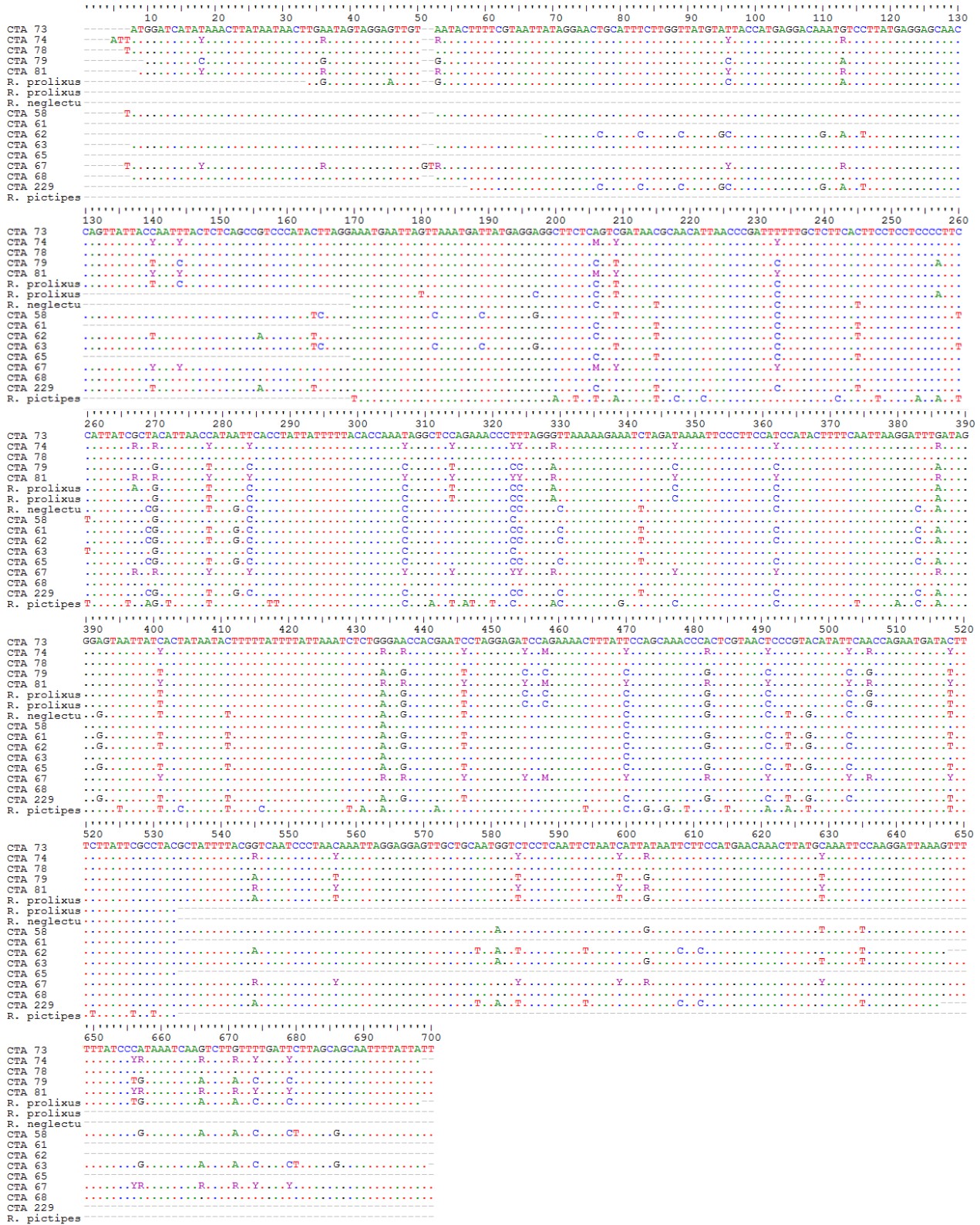


Figura 16 - Representação do alinhamento das sequências do fragmento do gene Cytb (700pb) obtidas no estudo e coletadas do GenBank®. Na legenda da figura o número de CTA das espécies estudadas.

4.4 Análise filogenética:

Para gerar a árvore filogenética foi necessária a escolha de um grupo externo a fim de que a árvore fosse enraizada. A espécie escolhida foi *Rhodnius pictipes*, pois esse apesar estar inserido em um complexo próximo ao complexo *R. prolixus* possui um distanciamento genético adequado para enraizar a árvore, sua sequência foi obtida do GenBank®. O dendograma foi construído por meio do método estatístico *Neighbor-joining*, com adição do teste filogenético *Bootsrap*. Os resultados gerados pela análise do gene *Cytb* inseriram em um mesmo clado as amostras referentes às colônias 67, 68, 73, 74, 78 e 81 juntamente com a sequência de *R. prolixus* coletada no GenBank®. No clado seguinte as sequências 58 e 63 permaneceram agrupadas; seguido por outro clado formado pela amostra correspondente a colônia 79 e a sequência obtida do GenBank®. Todos esses cladros foram agrupados em um clado maior. As amostras referentes às colônias 61, 62, 65 e 229 correspondente a *R. neglectus* permaneceram agrupadas a sequência de *R. neglectus* obtida do GenBank®, esse clado encontra-se mais afastado evolutivamente dos outros (Fig. 17).

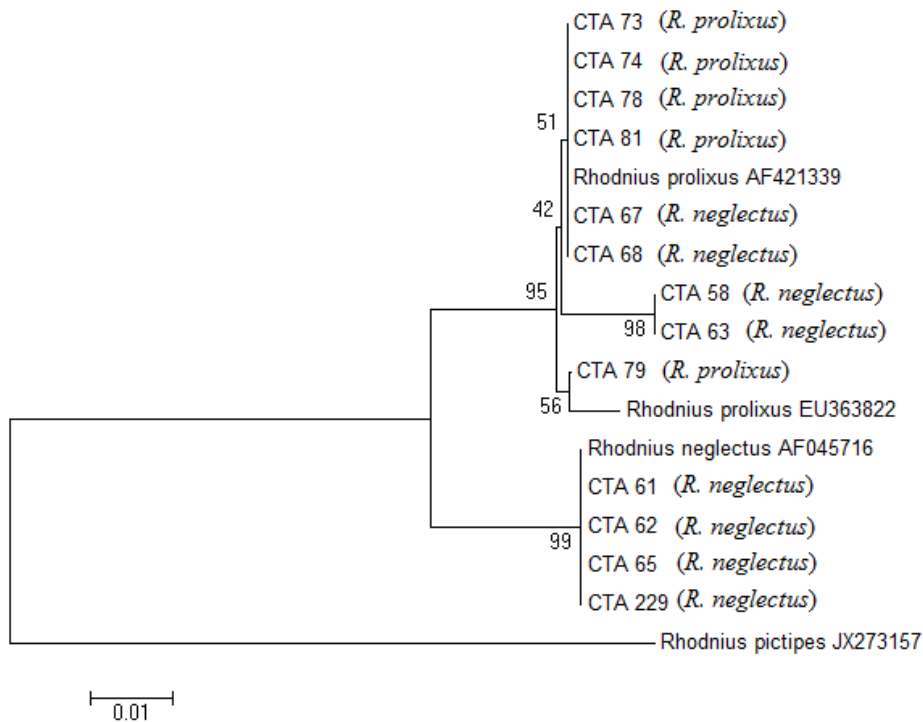


Figura 17. Dendograma filogenético do fragmento do gene *Cytb*, baseado na análise *Neighbor-Joining*. Sequências referentes às CTAs estudadas com adição de sequências disponíveis no GenBank®.

4.5 Morfologia:

4.5.1 Presença ou ausência de colarinho:

Segundo citado anteriormente por Forattini e Barata (1974) um aspecto macroscópico usado como um meio para diferenciação entre *R. neglectus* e *R. prolixus* é a presença ou não de uma aglutinação próxima ao opérculo, denominada “colarinho”. Na figura 18, observamos a presença de colarinho nas amostras referentes as colônias: 61, 62, 63, 65 e 229. As amostras referentes às colônias: 58, 67 e 68, marcadas com asterisco, não apresentaram tal característica.

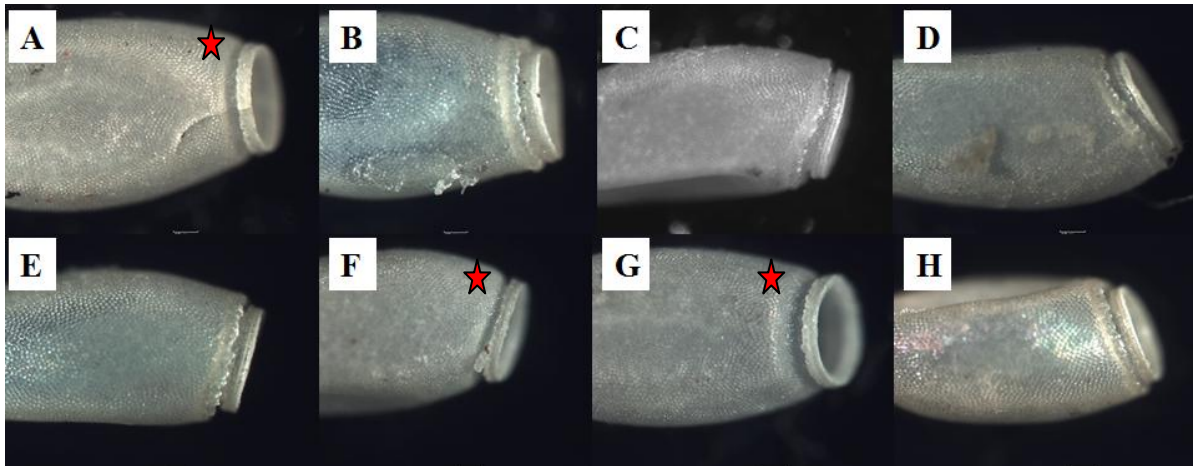


Figura 18 - Imagens captadas de ovos em aumento 50x, para avaliação da existência de “colarinho” em colônias identificadas como *R. neglectus*. É possível notar a ausência de colarinho, marcados com estrela, em A (CTA 58), F (CTA 67) e G (CTA 68). E presença de colarinho em B (CTA 61), C (CTA 62), D (CTA 63), E (CTA 65) e H (CTA 229)

A Fig. 19, mostra imagens captadas referentes a colônias identificadas como *R. prolixus*, todas as colônias seguiram o padrão descrito para a espécie, ou seja, não exibiram a existência de “colarinho”.

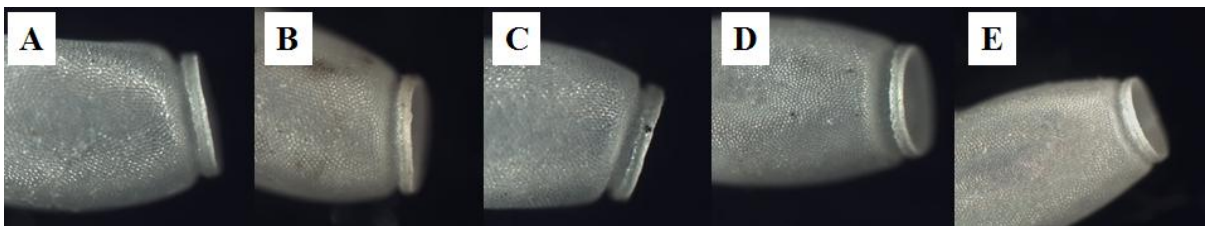


Figura 19 - Imagens captadas de ovos em aumento 50x, para avaliação da existência de “colarinho” em colônias identificadas como *R. prolixus*. É possível notar a ausência de colarinho em A (CTA 73), B (CTA 74), C (CTA 78), D (CTA 79) e E (CTA 81)

4.5.2 Processo mediano do pigóforo (genitália masculina):

Utilizando as imagens presentes no capítulo “Genitálias dos machos e sua importância na taxonomia” dos autores Lent & Galvão para comparação com as imagens fotografadas das genitálias dos machos das colônias trabalhadas pudemos observar que: as colônias 58, 63, 68, 73, 74, 78, 79 e 81 possuem um padrão semelhante ao processo mediano do pigóforo descrito com de *R. prolixus* no capítulo acima citado. Assim como as colônias 61, 62, 65, 67 e 229 possuem um padrão semelhante ao descrito como pertencente a espécie *R. neglectus* (Fig. 20).

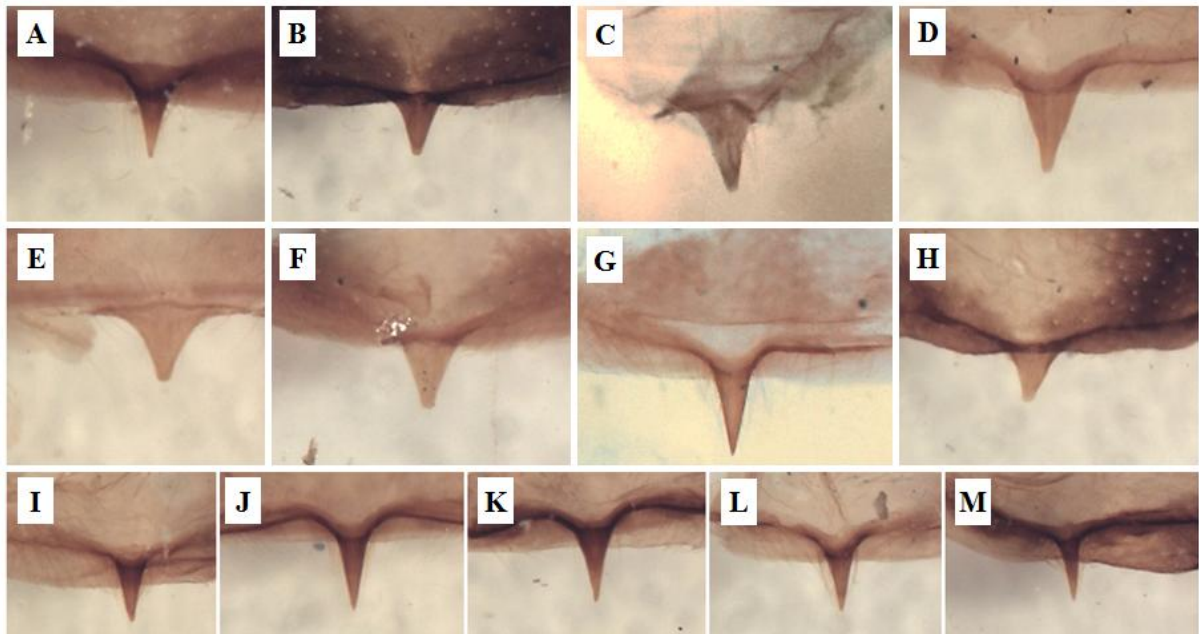


Figura 20 - Imagens captadas em aumento de 40x para avaliação do processo mediano do pigóforo das populações de interesse de *R. neglectus* e *R. prolixus*. Sendo *R. neglectus*: A. CTA 58, B. CTA 61, C. CTA 62, D. CTA63, E. CTA 65, F. CTA 67, G. CTA 68 e H. CTA 229 e *R. prolixus*: I. CTA 73, J. CTA 74, K. CTA 78, L. CTA 79 e M. CTA 81

4.5.3 Ângulo anterolateral

Foi observado o padrão dos ângulos anterolaterais nas colônias de *R. neglectus* e *R. prolixus* (Fig. 21), sabendo-se que *R. neglectus* possui ângulos laterais proeminentes, diferente de *R. prolixus* em que a estrutura possui formato mais arredondado não tão proeminentes. Os padrões encontrados foram agrupados então da seguinte maneira as colônias, padrão

correspondente a *R. neglectus*: 61, 62, 63*, 65 e 229; padrão correspondente a *R. prolixus*: 58, 63*, 67, 68, 73, 74, 78, 79 e 81. É necessário destacar que a colônia 63, identificada como *R. neglectus* apresentou nos espécimes analisados padrões compatíveis com *R. neglectus* e *R. prolixus*, como é possível observar na figura abaixo (imagens D e E).

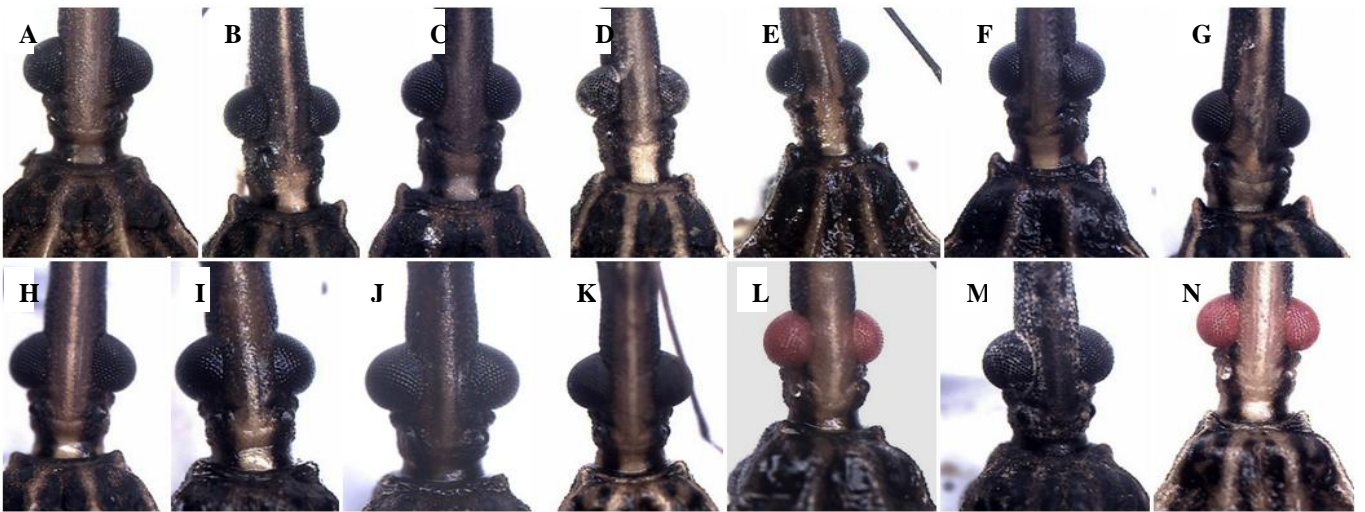


Figura 21 - Imagem capturada com aumento de 12,5x evidenciando o padrão dos ângulos anterolaterais das colônias estudadas de *R. neglectus* e *R. prolixus*. *R. neglectus*: A.CTA 58, B.CTA 61, C.CTA 62, D.CTA 63, E.CTA 63, F.CTA 65, G.CTA 229, H.CTA 67 e I.CTA 68. *Rhodnius prolixus*: J.CTA 73, K.CTA 74, L.CTA 78, M.CTA 79 e N.CTA 81.

4.6 Morfometria geométrica

Observando-se o mapa fatorial abaixo (fig. 22) gerado pela análise discriminante é possível observar a formação de dois agrupamentos de colônias distintos, sendo o da direita composto pelas colônias: 61, 62, 63, 65 e 229. E o da esquerda pelas colônias: 58, 67, 68, 73, 74, 78, 79 e 81. O fator 1 foi responsável por uma variação de 14.10%, tendo uma maior influencia na construção do mapa fatorial, já o fator 2 variou em 6.88%.

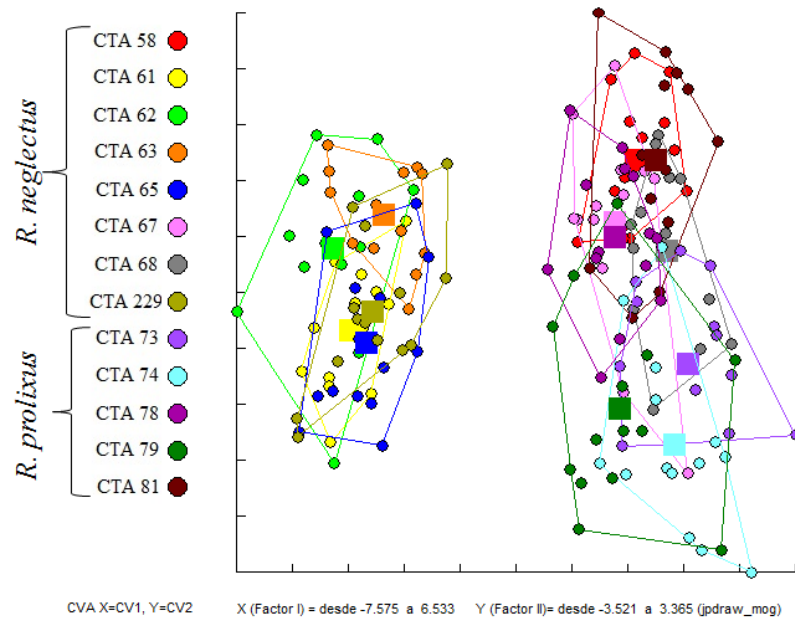


Figura 22 - Mapa fatorial da análise discriminante da cabeça dos triatomíneos estudados de colônias identificadas como *R. neglectus* e *R. prolixus*.

A figura abaixo (fig. 23) que retrata as formas encontradas quando as *landmarks* foram conectadas podemos observar a formação de dois padrões distintos de cabeça das colônias estudadas. Sendo que as colônias 58, 67, 68, 73, 74, 78, 79 e 81 possuem uma forma menos alongada e mais larga em comparação a forma obtida para as colônias 61, 62, 63, 65 e 229 que possuem uma estrutura mais alongada e estreita.

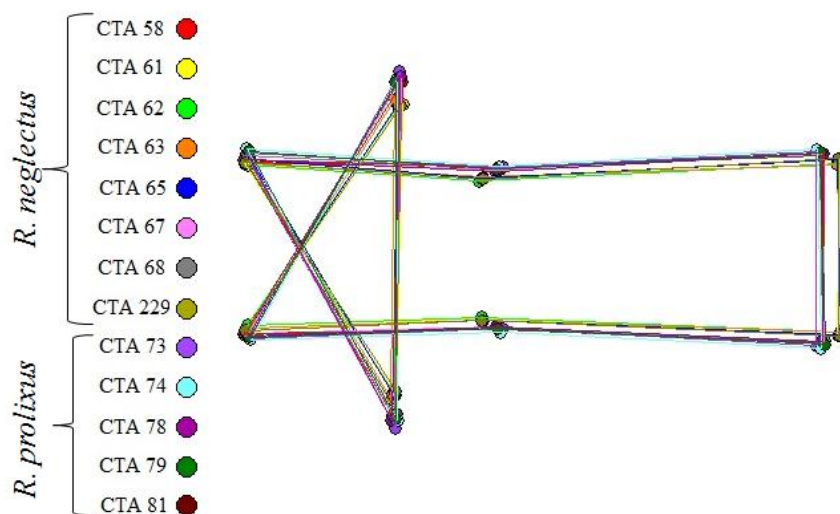


Figura 23 - As *landmarks* quando conectadas demonstram a existência de dois padrões de cabeça nas colônias estudadas.

Tendo em vista a grande gama de resultados podemos observar a seguir os resultados dos diferentes parâmetros estudados para cada colônia, além de possuir a identificação das colônias anteriormente aos estudos e a identificação sugerida após a análise dos resultados obtidos no estudo (Tab. 5).

Segundo os resultados obtidos nesse estudo as colônias: 61, 62, 65, 229, 73, 74, 78, 79 e 81 estão corretamente identificadas. O estudo, porém sugere que as colônias: 58, 67 e 68, sejam identificadas, após a análise dos resultados, como *R. prolixus*. A colônia 63, no entanto não obteve por este estudo parâmetros claros para ser identificada nem como *R. neglectus* nem como *R. prolixus*, não devendo ser utilizada como representante confiável de ambas as espécies.

Tabela 4 - Representação dos resultados obtidos pelas diversas técnicas utilizadas, sendo que a cor azul corresponde ao padrão de *R. neglectus* e a cor vermelha de *R. prolixus*.

CTA	Identificada anteriormente como:	Citocromo B		Pigóforo		Colarinho		Ângulo anterolateral		Geomorfometria de cabeça		Identificada posteriormente como:
		Rn	Rp	Rn	Rp	Rn	Rp	Rn	Rp	Rn	Rp	
58	<i>R. neglectus</i>											<i>R. prolixus</i>
61	<i>R. neglectus</i>											<i>R. neglectus</i>
62	<i>R. neglectus</i>											<i>R. neglectus</i>
63	<i>R. neglectus</i>											?
65	<i>R. neglectus</i>											<i>R. neglectus</i>
67	<i>R. neglectus</i>											<i>R. prolixus</i>
68	<i>R. neglectus</i>											<i>R. prolixus</i>
229	<i>R. neglectus</i>											<i>R. neglectus</i>
73	<i>R. prolixus</i>											<i>R. prolixus</i>
74	<i>R. prolixus</i>											<i>R. prolixus</i>
78	<i>R. prolixus</i>											<i>R. prolixus</i>
79	<i>R. prolixus</i>											<i>R. prolixus</i>
81	<i>R. prolixus</i>											<i>R. prolixus</i>

5 DISCUSSÃO

O estudo de triatomíneos se faz importante nos dias de hoje, pois apesar de iniciativas de controle, a transmissão vetorial corresponde ainda há aproximadamente 80% dos casos da doença de Chagas. É sabido também que a identificação errônea entre *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* gerou e ainda geram muita contradição na dispersão das espécies em território brasileiro e levanta a dúvida da ocorrência ou não de *R. prolixus* no país. Dias et al. (2002) considera a ocorrência de *R. prolixus* no Estado do Amazonas e Tocantins, já Galvão (2014) não considera a ocorrência da ocorrência da espécie em território nacional, assim como Jurberg et al. (2014).

Neste estudo foi feita uma análise multiparamétrica a fim de verificar a eficiência de uma diferenciação taxonômica quando realizada por apenas um parâmetro ou em conjunto. Sabemos há muito da dificuldade em se encontrar parâmetros que possam diferenciar com precisão espécies do complexo *R. prolixus*, Barrett (1988), por exemplo, descreveu o gênero *Rhodnius* como um gênero composto por espécies que não possuem um limite interespecífico claro e com muitas semelhanças morfológicas entre as espécies, principalmente as do complexo *R. prolixus*. Avaliando-se os resultados obtidos os parâmetros moleculares e geomorfométricos se mostraram particularmente positivos.

Monteiro et al. (2000) observou ao realizar análise filogenética a partir do gene *Cytb* alguns espécimes anteriormente identificados como *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus* alocados em clados de outras espécies, sugerindo que os caracteres morfológicos empregados para identificar estas espécies atualmente não são totalmente confiáveis, o que corrobora com os resultados moleculares obtidos neste estudo, uma vez que colônias anteriormente identificadas como *R. neglectus* apresentaram uma distância genética menor com espécimes identificados como *R. prolixus*. Abad-Franch et al. (2013) utilizando gene *Cytb* para análise filogenética de diversas espécies também demonstrou distanciamento genético existente entre *R. neglectus* e *R. prolixus* estando também de acordo com os resultados obtidos nesse estudo. Lyman et al. (1999) demonstrou em seu trabalho, dentre as

muitas espécies estudadas, a possibilidade de se separar as espécies *R. neglectus* e *R. prolixus* utilizando *Cytb*, além também demonstrar a existência da distância genética entre eles, resultado esse que se mostra em concordância com os evidenciados em nosso estudo.

Monteiro et al. (2000) chamou ainda atenção para a necessidade da busca de caracteres úteis na identificação do complexo *R. prolixus*, devido a essa necessidade procuramos estudar parâmetros morfológicos já descritos na literatura, verificando sua eficácia diante das espécies estudadas. Forattini e Barata (1974) sugeriram a diferenciação entre *R. neglectus* e *R. prolixus* por meio de características encontradas em seus ovos, sendo um dos principais parâmetros a presença ou ausência de colarinho, em nosso trabalho pudemos observar que tal parâmetro foi válido para a separação das colônias, se avaliado de maneira individual, porém quando confrontado com os resultados moleculares foi notado que a colônia 63 identificada como *R. neglectus* e detentora de colarinho possuía uma menor distância genética com espécimes identificados como *R. prolixus*.

Sabendo-se da disparidade de resultados da colônia 63 entre os parâmetros previamente estudados, foi observado então o formato do ângulo anterolateral, Lent e Wygodzinsky (1979) em sua revisão demonstram existir uma diferença morfológica no caractere em questão para as espécies *R. neglectus* e *R. prolixus*. O padrão distinto entre as espécies ficou demonstrado para todas as colônias analisadas, a colônias 63, entretanto, apresentou padrão correspondente a *R. neglectus* e *R. prolixus*, por não haver na literatura relato da variação da morfologia do ângulo anterolateral levantou-se a hipótese de uma hibridização, em Carcavallo et al. (1998) existe o relato de uma possível hibridização entre *R. neglectus* e *R. prolixus*, o que explicaria inclusive a dualidade de padrão encontrado nos resultados dos parâmetros analisados.

Jurberg et al. (1997), consideraram a genitália masculina como um parâmetro importante na diferenciação entre espécies do gênero *Rhodnius*, portanto o processo mediano do pigóforo foi analisado visando observar seu desempenho entre espécies similares. Por meio dessa análise foi possível observar a existência de dois padrões entre as colônias estudadas condizentes com *R. neglectus* e *R. prolixus*. A colônia 67, identificada como *R. neglectus*,

que até então havia apresentado em todos os outros parâmetros padrões semelhantes a *R. prolixus* apresentou padrão semelhante a *R. neglectus*, corroborando com Soares et al. (1999) que chamou atenção para a necessidade de se utilizar outros parâmetros juntamente com a genitália masculina caso a diferenciação seja entre espécies do complexo *R. prolixus*.

Em seu trabalho Gurgel-Gonçalves (2008) discorre sobre a importância que a morfometria geométrica tem adquirido nos últimos anos para resolução de problemas taxonômicos, optamos então por incluir essa ferramenta promissora neste trabalho. Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam o valor desse parâmetro na diferenciação entre *R. neglectus* e *R. prolixus*, resultados esses que contradizem Dujardin et al (1997) que destaca em seu trabalho que a morfometria geométrica de cabeça apresentaria uma importância menor em relação a asa como parâmetro geral de diferenciação morfológica. Os resultados se mostraram em consonância com Gonçalves (2008) que declara a morfometria geométrica, incluindo o parâmetro de cabeça como um método útil na separação de espécies similares de *Rhodnius*.

As colônias 58, 67 e 68, anteriormente identificadas como *R. neglectus* e que tinham como pontos de coleta cidades do Estado de São Paulo, durante a análise deram indicativos de pertencerem na verdade a *R. prolixus*, é sabido que a ocorrência dessa espécie não é aceita no Estado de São Paulo, portanto esse achado levanta a suspeita de problemas de identificação quando já em laboratório.

A realização deste estudo gerou uma grande quantidade de dados tanto moleculares, quanto geomorfométricos e morfológicos de espécies de *R. neglectus* e *R. prolixus* mantidas em laboratório, podendo contribuir futuramente como base para comparações com colônias de campo ou outras colônias mantidas em laboratório.

Diante dos resultados abordados é possível notar que para uma avaliação de colônias do ponto de vista de sua identificação os resultados se tornaram muito mais coerentes e confiáveis quando parâmetros distintos foram utilizados em conjunto.

6 CONCLUSÃO

- A partir dos parâmetros utilizados verificou-se que as colônias 58, 63, 67 e 68, não apresentaram os padrões estabelecidos para as espécies em que foram anteriormente classificadas. As demais colônias seguiram os padrões estabelecidos para suas respectivas espécies.

- Apesar do citocromo b ter se mostrado válido na separação das populações de *R. neglectus* e *R. prolixus* mantidas em laboratório, mais um marcador seria de grande valia para dar suporte aos resultados gerados pelo Cytb. No caso do citocromo oxidase I não foi possível sua validação devido a sua não amplificação nas espécies estudadas.

- O aspecto morfológico de presença ou ausência de colarinho nos ovos de diferentes populações de *R. neglectus* e *R. prolixus* foi analisado e mostrou-se útil, porém os resultados passam uma maior segurança quando utilizados em conjunto com outros parâmetros.

- A análise da morfologia da genitália masculina, com ênfase no processo mediano do pigóforo se mostrou útil para distinção de *R. neglectus* e *R. prolixus*, apesar disso não é recomendado sua utilização de maneira isolada e sim juntamente com outros parâmetros, visando uma maior confiabilidade dos resultados.

- A morfometria geométrica de cabeça mostrou-se promissora na separação de populações de *R. neglectus* e *R. prolixus*, mas para uma maior coerência de resultados sugere-se agregar outros parâmetros.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* v 112, p. 159-177. 2009.

ABAD-FRANCH, F. et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 108, supl. 1, p. 92-99, 2013.

ALMEIDA, C.E. et al. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? *Med Vet Entom*, UK (United Kingdom), v. 23, n. 4, p. 410-417, 2009.

ARAS, R et al. Transmissão vetorial da Doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med Trop* v. 36, p. 359-363, 2003.

BARATA, J.M. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II – Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera – Reduviidae). *Rev. Saúde Pública*, v. 15, supl. 5, p. 490-542, 1981.

BARRETT T.V. Current research on Amazonian Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 83, supl. I, p. 441-447. 1988.

BELINATO, M.R.F. Efeito dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em aspectos do fitness de *Rhodnius prolixus*. 2014. 120 f. Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. 2014.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. "*Trypanosoma cruzi*" e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979.

CARCAVALLO, R.U. et al. Atlas dos vetores da Doença de Chagas nas Américas. Organizado por Rodolfo U. Carcavallo, Itamar Galíndez Girón, José Juberg e Herman Lent – Rio de Janeiro: Fiocruz., Vol. II, cap. 12, 393 pág. 1998.

CARCAVALLO R.U. et al. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vec*, v.7, supl. 1, p. 1-99. 2000.

CARVALHO DB et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasion in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. *Acta Trop*. v. 130, p. 35-38. 2014.

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 seqüências do 16S rDNA mitocondrial. *Rev. Bras. Entomol.*, São Paulo , v. 52, n. 3, 2008 .

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

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. Transfusional transmission control of chagas' disease in the southern cone initiative. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. v. 31, supl.4. 1998.

DIAS J.C.P. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectiva de prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*; v.35, p.669-78. 2002.

DIAS, L. R. Identificação de antígenos salivares imunogênicos de triatomíneos e avaliação de sua eficiência como marcadores de contato para *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae): o papel da apirase salivar. 66 f. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2006.

DUJARDIN J.P. et al. The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop.*, v.66, p. 145–153. 1997

FERREIRA FILHO, J. C. R. et al . Soropositividade para doença de Chagas entre doadores de sangue em Araraquara, Estado de São Paulo, no período de 2004 a 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 44, n. 1, 2011.

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, p. 294-299. 1994.

FORATTINI, O. P; BARATA, J. M. S. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo , v. 8, n. 4, p. 447-450, dez. 1974 .

FORERO, D. et al. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactocorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, v.70, p.1-12, 2004.

GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, v.202, p.1-36. 2003.

GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series.

GARDIM, S. Relações filogenéticas entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais. 2010. 92f + anexo. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

GARDIM, S. Diagnóstico molecular e relações filogenéticas entre nove espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). 2013. 100 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro , v. 95, n. 4, 2000 .

GONCALVES, T. C. M. et al. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro , v. 108, n. 4, 2013.

GURGEL-GONÇALVES R. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in Central Brazil? *Acta Trop* v.107, p.90-98, 2008.

GURGEL-GONCALVES, R.; CUBA, C. A. C.. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* Lent e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 24, n. 1, 2007.

JURBERG, J. et al. Genitálias dos machos e sua importância na taxonomia. "In: *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas* (R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent eds)". Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997, v. I, p. 85-106.

JURBERG, J. et al. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop*, v.9, supl.1, p. 123-128, 2009.

JURBERG J. et al. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas no Brasil). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2014.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas'disease and implications for human health. *Denisia*, v.19, p.1096-1116. 2006.

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

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 89-92, Sept. 1999.

LYMAN D.E et al. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, v.60, p. 377-386. 1999.

MENDONÇA, V. J. Estrutura genética de três membros do complexo *Triatoma brasiliensis* que ocorre no Estado da Bahia, com enfoque principal para *Triatoma sherlocki* Papa et al. 2002 (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). 2011. Tese (doutorado). Universidade de Campinas, 2011.

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

MONTEIRO F.A. et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*, v.62, p. 460-465, 2000.

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

NEVES S.C.T. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil. 2012, *Instituto Oswaldo Cruz*, <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/6922>

OLIVEIRA, J. Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2015.

PÁEZ-COLASANTE X.; ALDANA, E. Morfometría geométrica del borde corial y del collar de huevos de cinco especies del género *Rhodnius* Stal (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomo Brasiliis*, v.1, p. 57-61. 2008.

RODRIGUES, L.A.; SANTOS, V.F. Morfometria geométrica - aplicações em paleobiologia de Dinossáurios. *Ciências da Terra (UNL)*, v.5, p. 141-145. 2003.

RODRIGUES, V.L.C.C. et al. Detecção de triatomíneos da espécie *Rhodnius neglectus* em área urbana de municípios da região de Araçatuba. *Bepa Bol. epidemiol. paul. (Online)*, São Paulo, v. 6, n 63, Março 2009.

RODRIGUES, V.L.C.C. et al . Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, São Paulo*, v. 56, n. 3, p. 213-218, 2014.

ROSA, J. A. et al. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, 2010.

ROSA J. A. et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n.sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*. v. 3478, p.62-76. 2012.

SANTOS, C. M. et al. Comparative descriptions of eggs from three species of *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, 2009.

SANTOS, R.V.; COIMBRA J.R., C.E.A.,orgs. *Saúde e povos indígenas* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 251 p. ISBN 987-85-7541-277-(). Available from ScieELO Books [HTTP://books.scielo.org](http://books.scielo.org)

SCHOFIELD, C. J. Triatominae Biology & Control. West Sussex: Eurocommunica Publications, 1994.

SILVEIRA, A.C. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 2, p. S35-S42, Jan. 2000.

SOARES, R.P. et al. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.62, p. 157-161, 2000.

SOARES, R.P.P. et al. Characterization of *Rhodnius neglectus* from Two Regions of Brazil Using Isoenzymes, Genitalia Morphology and Morphometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 161-166, 1999.

SOTO-VIVAS A. Clave pictórica de triatóminos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. *Bol Mal Salud Amb*, v.49, supl. 2, p. 259-74. 2009.

WHO, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso as 23h00 no dia 12 de Fevereiro de 2016.

WESTPHALEN, E.V.N.; BISUGO, M.C.; ARAUJO, M.F.L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *BEPA, Bol. Epidemiol. (Online)*, São Paulo, v. 9, n. 105, set. 2012.

YEO M. et al. Origins of Chagas disease. *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Parasitology*, v.35, p. 225-233. 2005.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, 2009.

Capítulo II – Artigo

Artigo submetido a revista **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**

Differentiation of two *Rhodnius* by multiple parameters

Study of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatomine) laboratorial populations, by using cytochrome b, morphology and geometric morphometry.

Rossana Falcone^[1], Aline Rimoldi Ribeiro^[2], Jader de Oliveira^[1], Vagner José Mendonça^[3] and João Aristeu da Rosa^{[1]*}

^[1] Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brasil.

^[2] Departamento de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

^[3] Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina – Piauí.

*Corresponding Author: João Aristeu da Rosa (rosaja@fcar.unesp.br)

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Rodovia Araraquara-Jaú, km 1 – CP 502. Araraquara – SP – CEP 14801-902

+55 (016) 3301-6945

Tel.: +55 16 3301-6945, Fax: +55 16 33016940, e-mail address: rosaja@fcar.unesp.br

ABSTRACT

The *Rhodnius* genre includes 19 species, which can transmit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. It is considered one of the taxonomically complex genera of Triatominae but has patterns defined in relation mainly to biology and morphology. With the current development of molecular techniques it has become possible to characterize Triatominae species by mitochondrial and nuclear markers of the species as a more variable for the taxonomy of triatomines, allowing existing data can be verified and / or corrected. In this work it was obtained subsidies that advances knowledge that aggregates the existing, can provide a more detailed and accurate differentiation of the species included within the genre *Rhodnius*, in order to help to establish a more appropriate classification. Data collection was performed by DNA analysis, using mitochondrial marker - cytochrome b, and morphological and morphometric studies in order to distinguish four populations of *R. neglectus* and five of *R. prolixus*. Phylogenetic data were compared to morphological and morphometric to a more reliable result. The results obtained from analysis of Cytb fragment suggested that the colonies identified as *Rhodnius prolixus* belong to the species and as the *R. neglectus* analyzed. In comparison morphology was observed that the colonies originally identified as *R. prolixus* and *R. neglectus* have standard consistent the species, as well as in the presence of collar eggs in the standard median of pygophore process, the anterolateral angle and geometric morphometric.

Keywords: *Rhodnius*, taxonomy, phylogeny, cytochrome b, morphology, geometric morphometry.

INTRODUCTION

It is estimated that 6 to 7 million people have Chagas disease in the world, mostly in Latin America. The decrease in the incidence of transmission is mainly due to the adoption of measures to combat insect vector and implementation of immunological diagnostics in blood banks from the 70s and 80s making legally binding serologic evaluation in the Southern Cone Countries, donors before the transfusion.^{1,2,3,4,5.}

The vectorial transmission still is responsible for approximately 80% of cases of Chagas' disease, the severity of the infection depends on the age of the infected individual, physical and nutritional condition and is also related strains of the parasite.^{6,7,8.}

Chagas disease has become a problem for human health from the domiciliation of triatomines. Currently there are 151 described species of triatomine grouped into five tribes formed by 18 genres. Although the description of Triatominae advocates the concept of mandatory blood meal, it is currently known that triatomine bugs can feed on hemolymph of other insects.^{9, 10, 11,12,13,14, 15}

The species are described and classified based on morphological criteria that take into account the color of the connective, the pronotum, morphology and morphometry of eggs and body structures and the male genitalia that let you define tribes, genera and species.¹⁶

All triatomine species are potential vectors of *T. cruzi*, but only in some cases the conditions to transform the species in an actual vector, are filled, defined conditions as: to adapt to human dwellings, high degree of anthropophily, short time between hematophagism and defecation and wide geographical distribution.¹⁶

According to Gaunt and Miles¹⁷, the three most important genera of triatomines, from the epidemiological point of view, are: *Panstrongilus*, *Rhodnius* and *Triatoma*. Composed of 19 species of potential vectors, the *Rhodnius* genus is considered one of the taxonomically complex genera in Triatominae. The *Rhodnius* genus species have standards defined in

relation to biology, since most of the species is wild; live in palm fronds, tree holes, sucking blood from birds, rodents and bats, lay their eggs attached to the substrate which favors dispersion, active and passive, because many birds that nest in palm trees have migratory habits.

Several studies have adopted approaches to better define the different species of *Rhodnius* and their interrelations. As an example of these studies, there is the study of eggs, genital tract, the morphology of the salivary gland of ribosomal DNA, biogeography and phylogeny and the homogeneous staining always tending to light brown / dark, more or less pronounced stains.^{4, 11, 18}

The morphological similarities and geographical distribution which may overlap between some *Rhodnius*, difficult their study, although various techniques used for their distinction¹⁹. Therefore, the validation of complementary techniques makes it necessary for species with large morphological similarities be identified without major problems.

Rhodnius prolixus Stal has a major role as the main vector of Chagas disease in some areas of Central America and north of the South America, Venezuela, Colombia and Guyana, the species can be found in sixteen Latin American countries, plus some regions of the Amazon²⁰.

Rhodnius neglectus Lent, 1954, is considered a wild species, despite having already been found in human dwellings and have secondary role in the transmission of Chagas disease^{21,22}. This species is among those who have been occupying vacant niches after controlling for *Triatoma infestans* in the State of Goiás²³.

Between the species of the genus *Rhodnius*, *R. neglectus* it is that it is more widely distributed throughout Brazil, the Federal District and 11 states (GO, MS, MT, BA, PI, PE, MA, TO, MG, PR and SP) and is characteristic of the Cerrado biome. There is no occurrence of records of *R. neglectus* outside Brazil. In São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Tocantins and

Paraná invasions were recorded in peri- and intradomiciliary for this species which has shown low rates of *T. cruzi* infection²⁴. In sylvatic species it is associated with various species of palm trees as "babaçu" and "macaúba", using as a food source birds, marsupials and rodents. In the peridomicile is mainly found in chicken coops^{25, 39}.

In Sao Paulo State, from 1990 to 1999, they were collected 3,149 exemplars of *R. neglectus*, and 2,542 Intradomiciliary and 607 peridomiciliary with *T. cruzi* infection rates of 0.34% and 0.24%, respectively²⁶. In 2009 in Araçatuba were found *R. neglectus* colonizing palm trees and invading homes, the same was found in 2012 in Monte Alto^{27, 28}.

The specific identification and systematic of triatomines have been based primarily on morphological observations, in particular by means of optical microscopy. In the case of similar morphology populations when it is not possible to identify the species only to the classical morphological criteria, the use of other morphological and molecular approaches as is required, for example, the study of male and female genitalia, the comparative analysis structures by geometric morphometric and molecular analyzes to identify these species^{10, 29}.

The identification of species belonging to the genre *Rhodnius* has always been strongly linked to biological and morphological patterns and variations of both the identification of a general point of view this genre can rely without problems morphological aspects. Species-level identification, however, can be one of the hardest among triatomine, especially species complex *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* and *R. nasutus*). This difficulty may lead to an incorrect identification and result in loss to researchers that are based on data produced by research with misidentified species, and hinder the knowledge about the distribution of species, consequently complicates the orientation of actions to combat the vector²⁵.

In this work, the aim is to obtain data that aggregates the existing, will provide a more detailed differentiation and needs of the species of the *Rhodnius* genre, in order to contribute

to the taxonomic and phylogenetic studies of Triatomine by integrating morphological parameters of geometric morphometric and molecular tools.

Material and methods

The *Rhodnius* colonies used in this study came from the Insectarium Triatomine of the Faculty of Pharmaceutical Sciences / UNESP / Araraquara.

Four populations of *R. neglectus* and five *R. prolixus* were studied, as defined below:

Table 1. Colonies used, their origin, point of collection and start date of the CTA.

Colony of Triatominae of Araraquara	Species	Origin	Point of collection	Date
CTA 61	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	Palm tree (farm)	23/05/1983
CTA 62	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	Chicken Coop (farm)	23/05/1983
CTA 65	<i>R. neglectus</i>	Frutal/SP	dwelling (city)	05/08/1983
CTA 229	<i>R. neglectus</i>	Formoso/GO	City	27/06/2011
CTA 73	<i>R. prolixus</i>	Panamá, El Salvador e Costa Rica	NI	25/05/1983
CTA 74	<i>R. prolixus</i>	Venezuela	NI	25/05/1983
CTA 78	<i>R. prolixus</i>	Colômbia	NI	03/06/1982
CTA 79	<i>R. prolixus</i>	Venezuela	NI	05/09/1999
CTA 81	<i>R. prolixus</i>	Colômbia	NI	08/03/1982

NI: no information

Phylogenetic analysis

Genomic DNA was extracted from triatomine second modified protocol Bargues and Mas-Coma 1997. The tissue of choice was the leg muscles, to be free of contaminating microorganisms.

The primer used in the amplification of the cytochrome b gene (Cytb), has been described by Monteiro³⁰. Forward (F): 5'– GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC – 3' Reverse (R): 5'– GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA – 3', with annealing temperature set at 45°C. The PCR (Polymerase Chain Reaction) were performed in a thermocycler *BIO-RAD T100 Thermal Cycler*. To perform the PCR protocol was followed indicated by Thermo Scientific for the enzyme High Fidelity PCR Enzyme Mix, including temperatures and concentrations.

The PCR product was purified using the kit "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up" (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions for subsequent sequencing. The sequencing of the PCR product was processed by Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal campus.

Phylogenetic analysis was performed with the aid of Mega 6.0 program using the statistical method Neighbor-Joining, which generates dendograms based on genetic distance of the organisms, the length of the branches represents the proportion of divergent nucleotides. The addition of the phylogenetic test Bootstrap with 1000 replications, considering values above 75% well supported^{7,25}.

Morphology:

Eggs

Macroscopic aspect used in this study was the presence or absence of a close binding to operculum eggs, called "collar" described by Forattini and Barata³¹, considered a character that differentiates *R. neglectus* *R. prolixus*. 30 eggs were used and the captured images in stereoscopic microscope Leica MZ APO an increase of by 50x New Capture 2.0, and then was observed the presence or absence of "collar".

Median process pygophore (male genitalia)

For mounting the anatomic sample (pygophore) there was adaptation of a protocol approached by Eunice Galatti in 2015 in the discipline of Bioecology and Phlebotominae Identification. First was separated one male each colony and removed genitalia, that was then placed in a porcelain crucible in the presence of potassium hydroxide 10% 24 hours after parts have been separated in parameres, phallus and median process of pygophore, returned to the container for another 12 hours for clarification. Was carried out the alcohol dehydration process where the samples were placed for 10 minutes in 70% alcohol, 90%, 95% and absolute and dried at room temperature. Already dried, the pieces were immersed in Eugenol for 3 hours and then mounted between slide and coverslip in the presence of Canada balsam. The drying time of the slides at room temperature was approximately five days.

Anterolateral angle

For the analysis of the anterolateral angles, structures located on pronotum edge of the triatomines were collected images of 10 specimens of each colony, using stereomicroscope Leica MZ APO an increase of 20x through the New Capture 2.0, and was then observed the shape of the anterolateral angle. In *R. neglectus* species the structure appears well being prominent (Galvão, 2014). The species *R. prolixus* shows the structure in rounded shape and not as prominent as *R. neglectus*¹⁶.

Geometric morphometry

To analyze the geometric morphometry were collected images of the head 15 bugs through stereomicroscope Leica MZ APO an increase of 20x through the New Capture 2.0 program. Using the CLIC 98 program were applied to each image 8 anatomical landmarks selected from the Gurgel Gonçalves²⁵. The analysis of the collected coordinates was also made using the CLIC program 98 through an orthogonal method of projections called "Procrustes" in order to adjust the figures on a common point, the size centroid through translatory movements, scaling and rotation. The discriminant analysis was performed using the main components of "Procrustes" from the main components obtained in this analysis we built a factorial map with the first two principal components ("eigenvalues" CP1 and CP2) to observe the existence of difference between *R. neglectus* and *R. prolixus* (Fig. 1).

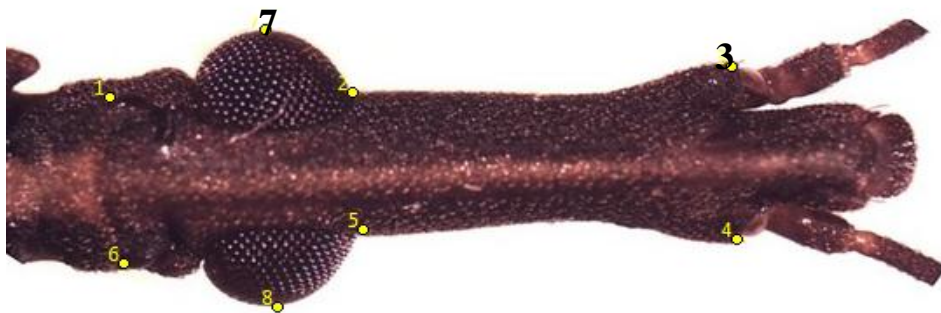


Figure 1. *Rhodnius neglectus* head showing the 8 landmarks selected for the realization of geometric morphometry. Points 1, 2, 5 and 6 are Type I (tissue juxtaposition) and points 3, 4, 7 and 8 of type II (maximum curvature).

RESULTS

Phylogenetic analysis

The Cytb gene sequences were manually set, then the junction was performed with all sequences including those selected and collected from GenBank® and then aligned.

Tabela 2. Access codes of sequences collected in GenBank® from the mitochondrial gene Cytb.

Species	Access code
<i>Rhodnius neglectus</i>	AF045716
<i>Rhodnius prolixus</i>	AF421339
<i>Rhodnius pictipes</i>	JX273157

The phylogenetic tree was rooted with outgroup of *Rhodnius pictipes*. The dendrogram was constructed using the statistical method Neighbor-joining, with the addition of bootstrap phylogenetic testing. The results generated by analyzing the Cytb gene inserted in the same clade samples relating to the colonies 73, 74, 78 and 81 along with the sequence of *R. prolixus* collected in GenBank®. The next clade was formed by the sequence of colony 79. These clades were grouped into a larger clade. The samples relating to the colonies 61, 62, 65 and 229 corresponding to *R. neglectus* remained grouped the sequence of *R. neglectus* obtained from GenBank®, this clade is furthest away from the other evolutionarily (Fig. 2).

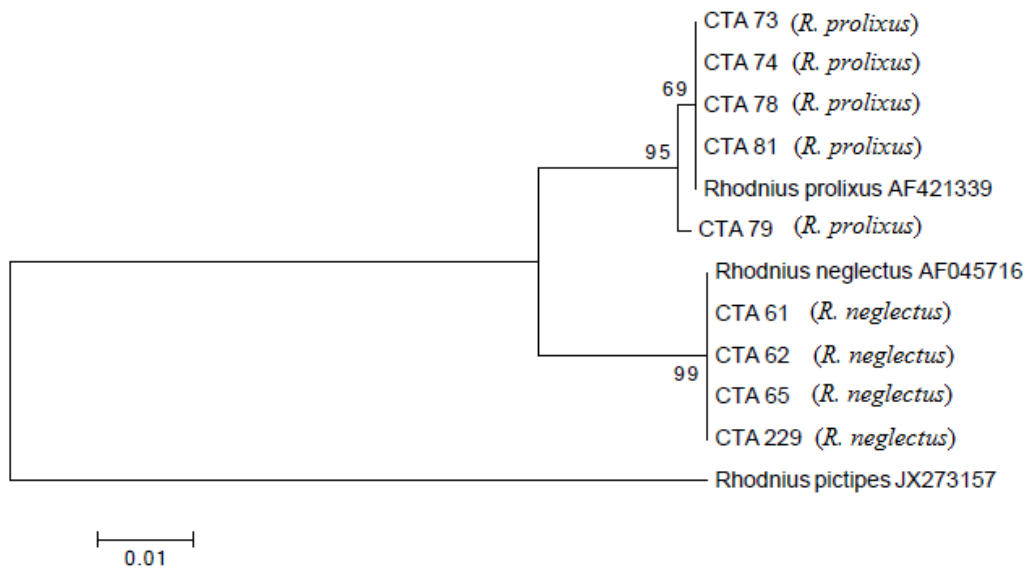


Figure 2. Phylogenetic dendrogram for gene fragment Cytb based on neighbor-joining analysis. Sequences related to CTAs studied with addition of sequences available in GenBank ®.

Morphology:

Presence or absence of collar:

According to previously mentioned Forattini and Barata³¹ a macroscopic aspect used as a means to differentiate between *R. prolixus* and *R. neglectus* is the presence or not of an agglutination next to the lid, called "collar". In Fig. 3, we observe the presence of the collar samples relating colonies: 61, 62, 65 and 229.

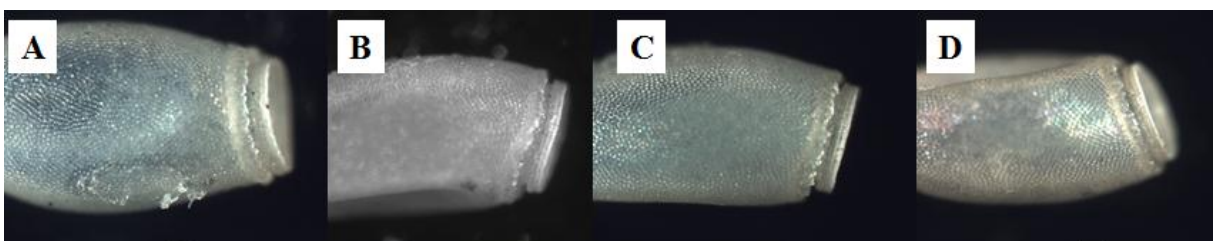


Figure 3. Images captured eggs in 50x increase, to evaluate the existence of "collar" in colonies identified as *R. neglectus*. You may notice the presence of collar in A (CTA 61), B (CTA 62), C (CTA 65) e D (CTA 229).

Rhodnius. prolixus, all colonies followed the pattern described for the species, exhibited no existence of the "collar" (Fig. 4).

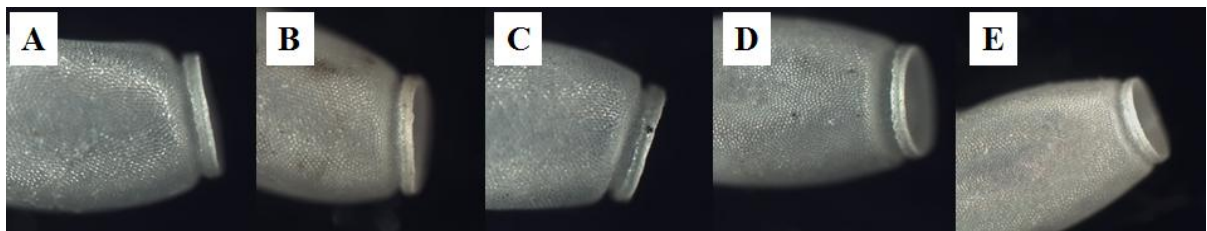


Figure 4. Images captured eggs in 50x increase, to evaluate the existence of "collar" in colonies identified as *R. prolixus*. You may notice the absence of collar in A (CTA 73), B (CTA 74), C (CTA 78), D (CTA 79) e E (CTA 81).

Median process pygophore (male genitalia)

By using the images present in the "genitalia of males and its importance in taxonomy" of Lent & Galvão³² authors for comparison with the images photographed the genitalia of males of the colonies studied was observed that: the colonies 73, 74, 78, 79 and 81 have a pattern similar to the median pygophore process described in *R. prolixus* in the chapter mentioned above. As the colonies 61, 62, 65 and 229 have a pattern similar to that described as belonging to *R. neglectus* species (Fig. 5).

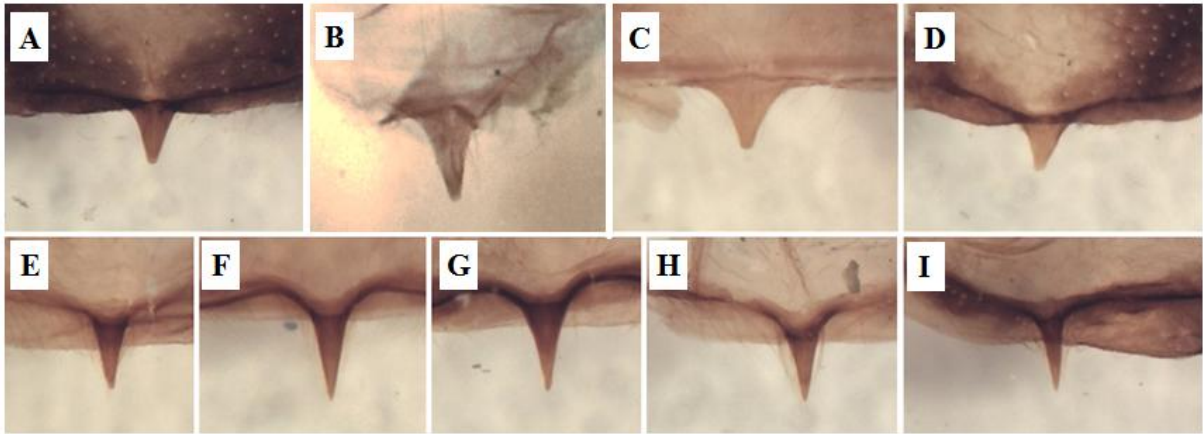


Figure 5. Images captured at 40x magnification to evaluate the median process of pygophore in populations of interest. Sendo *R. neglectus*: A- CTA 61, B- CTA 62, C- CTA 65 E D- CTA 229 e *R. prolixus*., E- CTA 73, F- CTA 74, G- CTA 78 , H- CTA 79 e I- CTA 81.

Anterolateral angle

Was observed the standard of anterolateral angles in colonies of *R. neglectus* and *R. prolixus* (Fig. 6), knowing that *R. neglectus* has prominent anterolateral angles different from *R. prolixus* wherein the structure has more rounded shape not so prominent. The patterns they found then grouped as follows colonies, corresponding pattern *R. neglectus*: 61, 62, 65 and 229; pattern corresponding to *R. prolixus*: 73, 74, 78, 79 and 81.

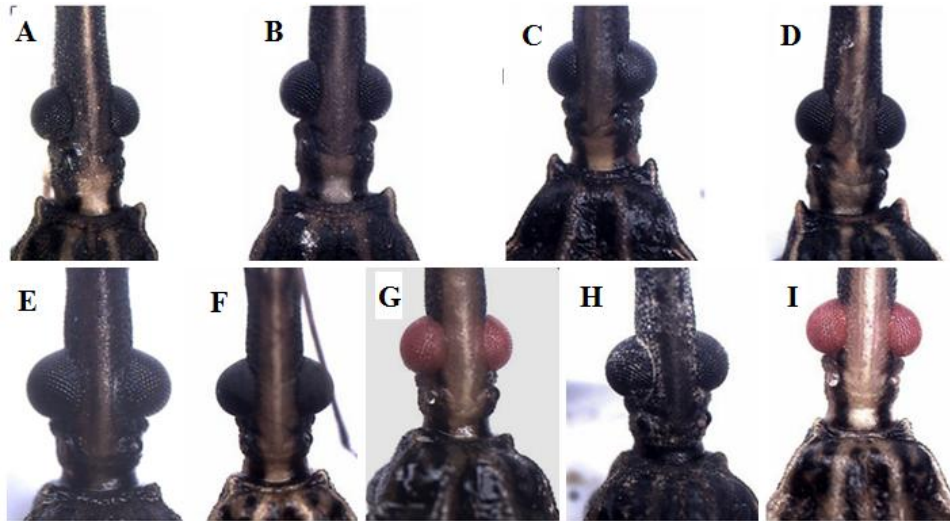


Figure 6. Image captured with an increase of 12.5x showing the pattern of the anterolateral angles of the studied colonies of *R. neglectus* and *R. prolixus*. *R. neglectus*: A-CTA 61, B-CTA 62, C-CTA 65 and D-CTA 229. *Rhodnius prolixus*: E-CTA 73, F-CTA 74, G-CTA 78, H-CTA 79 and I-CTA 81.

Geometric morphometry

Observing the factorial map below (Fig. 7) generated by the discriminant analysis is possible to observe the formation of two distinct groups of colonies being the right composed of colonies: 61, 62, 65 and 229. And left the colonies : 73, 74, 78, 79 and 81. factor 1 was responsible for a variation of 10.14%, with a greater influence on the construction of the factorial map, the factor 2 ranged was 6.88%.

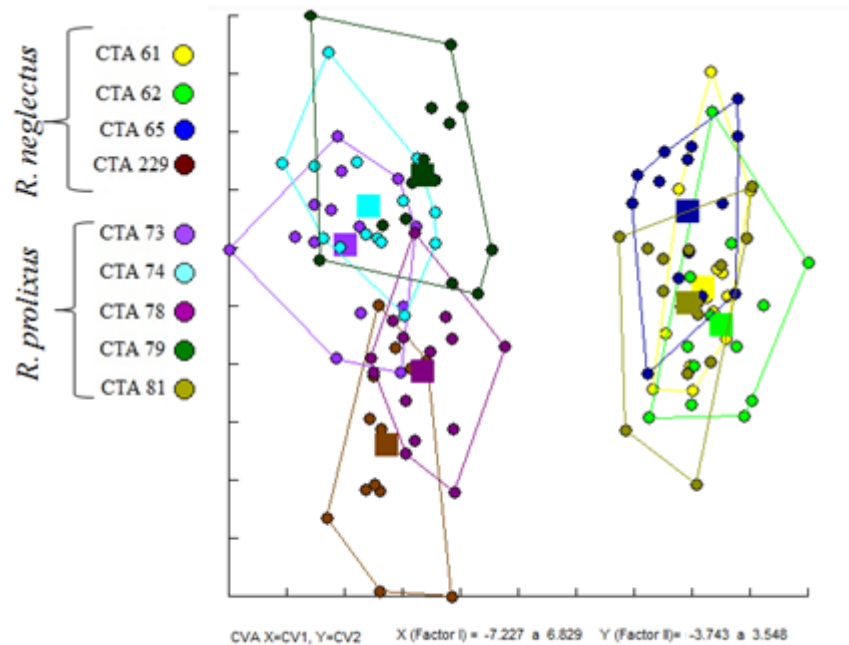


Figure 7. Factorial map of discriminant analysis of the head of triatomines studied colonies identified as *R. neglectus* and *R. prolixus*.

According to the results obtained in this study colonies: 61, 62, 65, 229, 73, 74, 78, 79 and 81 are correctly identified.

Discussion

The triatomine study is important today because despite control efforts, the vector transmission still mean for approximately 80% of cases of Chagas disease. It is also known that the misidentification of *Rhodnius neglectus* and *R. prolixus* generated and still generate a lot of contradiction in the dispersion of the species in Brazil and raises the question of the occurrence of *R. prolixus* in the country. Dias et al.⁴⁰ considers the occurrence of *R. prolixus* in the State of Amazonas and Tocantins, as Galvão¹⁴ does not consider the occurrence of the species is present in the country.

This study has made a multiparametric analysis to assess the effectiveness of a taxonomic differentiation when performed by only one parameter or together. We know there is a lot of trouble to find parameters that can differentiate precisely species complex *R. prolixus*, Barrett⁴¹, for example, described the *Rhodnius* genus as composed of species that do not have a clear interspecific limit and with many similarities morphological between species, especially the complex *R. prolixus*. Evaluating the results of the molecular and geomorphometric parameters were particularly positive.

Abad-Franch et al.³³ using *Cytb* gene for phylogenetic analysis showed several species existing genetic distance between *R. prolixus* and *R. neglectus* being in agreement with the results obtained in this study. Lyman et al.³⁴ showed in his work, among the many species studied, the possibility to separate the species *R. neglectus* and *R. prolixus* using *Cytb*, in addition also demonstrate the existence of genetic distance between them, a result that is shown in accordance with the evidenced in our study.

Monteiro et al.³⁵ also drew attention to the need to search for useful characters for identification of complex *R. prolixus* because of this need, we discuss morphological parameters described in the literature, verifying their effectiveness on the studied species. Forattini and Barata³¹ suggested the differentiation between *R. neglectus* and *R. prolixus* by features found in their eggs, one of the main parameters of the presence or absence of collar, in our work we observed that this parameter is valid for separation of the colonies.

Observed then the anterolateral angle format, Lent and Wygodzinsky¹⁶ in their review shows there is a difference in morphological

character in question for the species *R. neglectus* and *R. prolixus*. The distinct pattern between species was shown to all analyzed colonies.

Jurberg et al.³⁶, considered the male genitalia as an important factor in the differentiation between species of the genre *Rhodnius*, so the median process of pygophore was analyzed aiming to observe their performance between similar species. Through this analysis it was observed that there are two patterns among the colonies studied consistent with *R. neglectus* and *R. prolixus*. Smith et al.³⁷, which has drawn attention to the need to use other parameters along with the male genitalia if differentiation is complex between the species *R. prolixus* this study but it was effective.

In his work Gurgel-Gonçalves⁴¹ discusses the importance of geometric morphometric has acquired in recent years to solve taxonomic problems, then we decided to include this promising tool in this work. The results of this study reinforce the value of this parameter in the differentiation between *R. neglectus* and *R. prolixus* these results that contradict Dujardin et al.³⁸ which highlights in his work that the geometric morphometric head would present a minor over the wing as a general measure of morphological differentiation. The results were in accordance with Gurgel-Gonçalves⁴¹ declaring the geometric morphometric, including the head parameter as a useful method for separating similar species of *Rhodnius*.

This study generated a lot of molecular data, as geomorphometric and morphological of species of *R. neglectus* and *R. prolixus* maintained in the laboratory that can contribute as a basis for comparison with field colonies or other colonies maintained in the laboratory. In the development of this work it was observed that both the four populations of *R. neglectus*, the five of *R.*

prolixus have intra specific morphological and morphometric variability (Figs.5, 6, 7), although they are held in the laboratory for a long time (Table 1). The data obtained from the cytochrome b gene also showed existence of intraspecific variability of the molecular point of view.

Faced with the results discussed would be indicated that for colonies identification the results become more consistent and reliable when different parameters are used together.

Acknowledgments

To Eder dos Santos Souza, Heloisa Pinotti, Juliana Damieli Nascimento, Lucas Abrantes da Silva, Tiago Belintani for the assistance in Triatominae colonies maintenance. To Cleber Galvão and José Jurberg from Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos for the first specimens of *R. neglectus* of colonie CTA 229.

Financial Support

Financial support was provided by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, DF, Brazil) process 23038.005285/2011-2012, PADCF/FCF/UNESP.

Authors

Rossana Falcone - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista

Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/ São Paulo, Brasil. Email:

rossana_falcone@yahoo.com.br

Aline Rimoldi Ribeiro – Departamento de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Email: line2rimoldi@gmail.com

Jader de Oliveira - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista

Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/ São Paulo, Brasil. Email: jdr.oliveira@hotmail.com

Vagner José Mendonça - Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina – Piauí. Email: vag_jose@yahoo.com.br

João Aristeu da Rosa - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista

Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/ São Paulo, Brasil. Email: **rosaja@fcar.unesp.br**

The authors declare no conflicts of interest.

References:

1. Dias, JCP & Schofield, CJ, 1998. Transfusional transmission control of chagas' disease in the southern cone initiative. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 31(4).
2. Abad-Franch, F. et al., 2009. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica*. 112: 159-177.
3. Yoshida, N, 2009. Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104.
4. Santos CM et al., 2009. Comparative descriptions of eggs from three species of Rhodnius (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 7.
5. WHO, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Accessed February 12, 2016.

6. Aras, R et al., 2003. Transmissão vetorial da Doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 359-363.
7. GARDIM, S, 2010. Relações filogenéticas entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais. 92f + anexo. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.
8. Ferreira Filho, JCR. et al., 2011. Soropositividade para doença de Chagas entre doadores de sangue em Araraquara, Estado de São Paulo, no período de 2004 a 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44. 1.
9. Forero D. et al., 2004. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactocorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa* 670:1-12.
10. Neves SCT, 2012. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil. *Instituto Oswaldo Cruz*, <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/6922>
11. Rosa JA et al., 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* n.sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*. 3478:62-76.
12. Westphalen EVN et al., 2012. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Online)*, 9, 105.
13. Goncalves, TCM. et al., 2014. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108, 4.
14. Galvão, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series.

15. Mendonça, VJ et al., 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa*, [S.l.], 4107: 239–254.
16. Lent, H., Wygodzinsky, P, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Natur Hist* 163: 123-520.
17. Gaunt, M.; Miles, M, 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95, 4.
18. Jurberg J. et al., 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9 (1): 123-128, 2009.
19. Soares RP et al., 2000. Identification off morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 157-161.
20. Jurberg, J. & Galvão, C, 2006. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas'disease and implications for human health. *Denisia*, 19:1096-1116.
21. Rosa JA et al., 2010. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105, 3.
22. Rosa JA et al., 2014. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. *Parasit Vectors*. 7:17.
23. Santana DB, 2006. Biologia comparativa de *R. neglectus* e *R. robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório e infecção experimental pelo *Trypanosoma rangeli* com ênfase nos aspectos ultraestruturais das glândulas salivares infectadas. Brasília. Tese. Disponível em:

http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/5207/1/2006_Daniella%20Barreto%20Santa%20na.pdf

24. Gurgel-Goncalves R.; Cuba CAC, 2007. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* Lent e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, 24, 1.
25. Gurgel-Gonçalves R et al., 2008. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in Central Brazil? *Acta Trop* 107: 90-98.
26. Rodrigues VLCC. et al., 2009. Detecção de triatomíneos da espécie *Rhodnius neglectus* em área urbana de municípios da região de Araçatuba. *Bepa Bol. epidemiol. paul. (Online)*, 6, 63.
27. Carvalho DB et al., 2014. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasion in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. *Acta Trop.* 130: 35-38.
28. Rodrigues VLCC et al., 2014. COLONIZATION OF PALM TREES BY *Rhodnius neglectus* AND HOUSEHOLD AND INVASION IN AN URBAN AREA, ARAÇATUBA, SÃO PAULO STATE, BRAZIL. *Rev. Inst. Med. trop.* 56: 213-218.
29. Oliveira J. 2015. Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).– Araraquara, 90 f. 2015 Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/132004>
30. Monteiro F.A et al. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12: 997-1006.
31. Forattini, OP; Barata JMS, 1974. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo , 8: 447-450.

32. Carcavallo RU et al., 1998. Atlas dos vetores da Doença de Chagas nas Américas. Organizado por Rodolfo U. Carcavallo, Itamar Galíndez Girón, José Juberg e Herman Lent – Rio de Janeiro: Fiocruz., Vol. II, cap. 12, 393 pág.
33. Abad-Franch, F. et al., 2013. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108: 92-99.
34. Lyman D.E et al., 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
35. Monteiro FA et al., 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-465.
36. Jurberg, J. et al. Genitálias dos machos e sua importância na taxonomia. 1997, vol I, p. 85-106. “In: *Atlas of Chagas’ Disease Vectors in the Americas* (R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent eds)”. Editora Fiocruz – Rio de Janeiro.
37. Smith, R. J. 1999. Statistics of sexual dimorphism. *J. Hum. Evol.* 36:423-459.
38. Dujardin J.P. et al., 1997. The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop.*, 66: 145–153.
39. Galvão C et al., 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclature and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
40. Dias JCP, 2002. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectiva de prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*; 35:669-78.
41. Barrett TV, 1988. Current research on Amazonian Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 (Suppl. I): 441-447.
42. Gurgel-Gonçalves R et al., 2008. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? *Acta Trop* 2008; 107:90-98.