

Ester Tartarotti

Variabilidade Genética e Filogenia em Triatomíneos
(Triatominae, Heteroptera)

1910001188



ESTER TARTAROTTI

VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGENIA EM TRIATOMÍNEOS
(TRITOMINAE, HETEROPTERA)

**Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Genética.**

São José do Rio Preto - SP



ESTER TARTAROTTI

**VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGENIA EM TRIATOMÍNEOS
(TRIATOMINAE, HETEROPTERA)**

**Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Genética.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

São José do Rio Preto-SP



1.1.188/03



7575
T194v

20204000

Tartarotti, Ester

Variabilidade Genética e Filogenia em Triatomíneos (Triatominae, Heteroptera) / Ester Tartarotti . – São José do Rio Preto: [s.n.], 2002. 96 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Carlos Roberto Ceron

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética Animal. 2. Filogenia. 3. Variabilidade Genética. 4. Polimorfismo Genético. 5. PCR. 6. RFLP. 7. Sistemas Enzimáticos. 8. Triatominae-Heteroptera. I Tartarotti, Ester II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Variabilidade Genética e Filogenia em Triatomíneos (Triatominae, Heteroptera).

CDU – 575.8

Dedico esta Tese de Doutorado a meu marido Miguel Cardozo da Silva pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho, às minhas filhas Mayara Tartarotti Cardozo da Silva e Amanda Tartarotti Cardozo da Silva que, por vivenciarem a realização deste trabalho, souberam muitas vezes abrir mão da companhia materna e compartilharam as emoções e ansiedades desta obra. Dedico ainda a meus pais Geraldo Antonio Tartarotti e Ida Helena Tartarotti pelo amor e incentivo à realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Uma Tese representa uma etapa de grande importância na vida de uma pessoa, a realização de uma obra como esta envolve troca de informações e companheirismo. Esses componentes aliados à dedicação e amor por tudo aquilo que se faz gera o fruto de mais uma etapa concluída.

Saber agradecer é uma atitude de reconhecimento e carinho por todos aqueles que de alguma maneira contribuíram à realização desta obra. É saber a importância de como, cada um, a sua maneira, contribuiu com este trabalho.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron pelos ensinamentos, dedicação, crítica, compreensão e companheirismo durante a realização deste trabalho. Agradeço de forma especial o incentivo e reconhecimento que ele expressou em muitas etapas desta Tese.

De maneira especial agradeço ao Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama, da Universidade Federal de São Carlos, que me acolheu em seu laboratório e deu sugestões preciosas à realização deste trabalho. Agradeço toda sua disponibilidade e prontidão em colaborar. Admiro sua forma descontraída de encarar a vida. Agradeço a Isabel Cristina de Godoy, técnica do laboratório de Genética Bioquímica em São Carlos, por toda sua atenção e apoio.



À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira pelas importantes sugestões, atenção e carinho. Agradeço ainda toda simpatia, acolhimento e incentivo desde minha iniciação científica e mestrado. Agradeço de forma especial por todos estes anos de amizade e consideração.

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelas importantes sugestões, atenção e disponibilidade. Agradeço por sua consideração e amizade ao longo destes anos de pós-graduação.

À Profa. Cláudia Márcia Aparecida Carareto pelas importantes sugestões e disponibilidade. Agradeço também, o incentivo que proporcionou ao Programa de Pós-graduação em Genética durante seu mandato.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez, do Departamento de Química e Geociências, pelo apoio e disponibilidade de seu laboratório que foram de grande importância ao desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama pelas sugestões e críticas à qualificação desta Tese. Agradeço toda sua amizade, compreensão e companheirismo.

À Profa. Dra. Marlene K. Hosaki Kobayashi pela atenção, crítica e sugestões à qualificação deste trabalho. Agradeço pela amizade e incentivo.



À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo pelos conselhos, sugestões, atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. José S. Barata, Coordenador do Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo e aos amigos e funcionários deste Insetário, Sr. João Luis Molina Gil e Sr. João Mauricio Nóbrega da Silva Filho, pelo fornecimento dos triatomíneos utilizados no presente trabalho, disponibilidade e amizade.

Ao Departamento de Química e Geociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), UNESP, por proporcionar ambiente de trabalho adequado. Agradeço também aos funcionários João Rodrigues dos Santos e Rita Beatriz de Seixas. Em especial a Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira pelo carinho, apoio e compreensão em todas etapas deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia do IBILCE pela contribuição ao meu amadurecimento científico, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto, do Departamento de Zoologia do IBILCE, pelo apoio na análise estatística deste trabalho, atenção e disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento Biologia, pela consideração, apoio e carinho. Em especial à Simone Carvalho Fernandes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pelo atendimento e serviços prestados. De forma especial agradeço aos funcionários Rosana Miguel Gomes Ferro e Oscar José Marques pelo carinho e



disponibilidade. Agradeço também a Rosemar Rosa de Carvalho Brena que participou dos detalhes burocráticos finais desta Tese.

Aos funcionários da Biblioteca do IBILCE, pela competência e dedicação no atendimento. Em especial Elza Mítico Sato, que tanto se esforçou para colaborar com as referências deste trabalho.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pela convivência e apoio, em especial aos colegas Adriana Pasqueto Nascimento, Ana Paula Marques de Lima-Oliveira, Fábio Renato Lombardi, Hamilton Cabral, Juliana Polachini de Castro, Lilian Castiglioni Ruiz, Luciana Márcia Espinha de Santana, Luciane Madureira de Almeida, Marcos Roberto Higino Estécio, Patrícia Martins Casseb-Hassan, Patrícia Caetano de Souza e Rita de Cássia de Souza. Também agradeço aos meus colegas de laboratório Milla Alves Baffi e Marcos de Lucca Júnior pela amizade e carinho.

Ao INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-UNESP. Instituição que há tantos anos permite meu crescimento pessoal e profissional, merecedora de grande estima e consideração.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do IBILCE/UNESP –São José do Rio Preto e seus Coordenadores ao longo destes anos.

À Fundação de amparo à Pesquisa –FAPESP- pelo fomento científico. À FAPESP agradeço ainda toda prontidão e amparo durante a realização deste trabalho. Instituição de grande seriedade e brio científico que forneceu todo apoio necessário à realização desta Tese. Quero



expressar meu imenso reconhecimento à Instituição FAPESP, seus relatores e funcionários.

Ao meu querido esposo Miguel Cardozo da Silva pelo apoio e compreensão, às minhas amadas filhas Mayara e Amanda que mesmo tão pequenas souberam me compreender, aos Meus Pais, Geraldo Antonio Tartarotti e Ida Helena Tartarotti, pelo amor, carinho e incentivo. Agradeço também a meu estimado irmão Elder Tartarotti por toda sua amizade e disponibilidade.

Agradeço a **Deus**, força maior regente em nossas vidas, por mais esta etapa cumprida.



Se fez a Tese com gosto, há de querer continuá-la. Comumente quando se trabalha numa Tese só se pensa no momento em que ela estará terminada. Mas se o trabalho for bem feito, o fenômeno normal, após a Tese, é a irrupção de um grande frenesi de trabalho. Quer-se aprofundar todos os pontos que ficaram em suspenso, ir no encalço das idéias que nos vieram à mente mas que se teve de suprimir, ler outros livros, escrever trabalhos. E isto é sinal de que a Tese ativou o seu metabolismo intelectual, que foi uma experiência positiva. É sinal, também, de que já se é vítima de uma coação no sentido de pesquisar, à maneira de Chaplin em "Tempos Modernos", que continuava a apertar parafusos mesmo depois do trabalho: e será preciso um esforço para se refrear.

Se, de qualquer forma, se dedicar à pesquisa, descobrirá que uma Tese bem feita é um produto de que se aproveita tudo. Pode mesmo suceder que você volte a Tese anos depois. Porque ela ficará como o primeiro amor, e ser-lhe-á difícil esquecê-la.

Modificado de:

Umberto Eco

Como se faz uma tese (1996)

SUMÁRIO

Sumário.....	i
Lista de Figuras.....	iii
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Aspectos Epidemiológicos.....	1
I.2. Variabilidade Genética.....	11
I.2.1. Abordagem Filogenética.....	11
I.2.2. Abordagem Bioquímica e Molecular.....	22
II. OBJETIVOS.....	30
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
III.1. Insetos	31
III.2. Padrão de Esterases em Espécies do Gênero <i>Rhodnius</i>	31
III.3. Análise dos Sistemas Enzimáticos ME, MDH, GPI, IDH, PGM, GPD, SOD em Espécies dos Gêneros <i>Rhodnius</i> e <i>Triatoma</i>	33
III.4. Análises Filogenéticas.....	35
III.5. Análise da Região Intergênica do DNA Ribossômico (ITS-1) em Espécies dos Gêneros <i>Rhodnius</i> , <i>Triatoma</i> e <i>Panstrongylus</i>	35
IV. RESULTADOS.....	38
IV.1. Análise de Locos Esterásicos em Espécies do Gênero <i>Rhodnius</i>	38
IV.2. Diferenciação entre Espécies de Triatomíneos por Análise de Fenótipos Enzimáticos.....	48



IV.3. Estudo da Variabilidade da Região ITS-1 em Triatomíneos dos**Gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* por PCR e RFLP.....57****V. DISCUSSÃO60****VI. CONCLUSÕES.....75****VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77****VIII. RESUMO.....93****IX. ABSTRACT.....95**

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 01. (A) e (B) Padrões esterásicos comparativos em espécies do gênero *Rhodnius*. As setas indicam diferentes genótipos. Os números abaixo correspondem à amostras individuais das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*, 1-6); Rn (*R. neivai* 7-12); Rr (*R. robustus* 13-18). As bandas coradas em preto denotam atividade de α -esterase e as bandas coradas em vermelho, de β -esterase (página 39).

Figura 02. (A) e (B) Padrões esterásicos comparativos em espécies do gênero *Rhodnius*. As setas indicam diferentes genótipos. Os números abaixo correspondem à amostras individuais das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*); Rn (*R. neivai*); Rr (*R. robustus*). As bandas coradas em preto denotam atividade de α -esterase e as bandas coradas em vermelho, de β -esterase (página 40).

Figura 03. (A) e (B) Padrões esterásicos comparativos em espécies do gênero *Rhodnius*. As setas indicam diferentes genótipos. Os números abaixo correspondem à amostras individuais das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*); Rn (*R. neivai*); Rr (*R. robustus*). As bandas coradas em preto denotam atividade de α -esterase e as bandas coradas em vermelho, de β -esterase (página 41).

Figura 04. Zimograma representativo dos alelos para os locos esterásicos encontrados em *R. domesticus* (Rd); *R. neivai* (Rn); *R. robustus* (Rr). Demais dados da legenda como indicado nas figuras precedentes (página 42).

Figura 05. Padrão de inibição das esterases em triatomíneos. A) Controle. B) Inibição por pCMB 1mM. C) Controle D) Inibição por pCMB a 2mM. E) Controle. F) Inibição por pCMB a 4mM. Rd (*R. domesticus*, 1-3); Rn (*R. neivai*, 4-6); Rr (*R. robustus* 7-9) (página 43).

Figura 06. Padrão de inibição das esterases em triatomíneos. A) controle, B) Inibição por iodoacetamida a 2mM. C) Inibição por Malathion a 2mM. D) Inibição por sulfato de eserina a 1,5 mM. Regiões inibidas indicadas nas figuras. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), Rr (*R. robustus*) (página 44).

Figura 07. Padrão de inibição esterásico em triatomíneos. A) Controle. B) Padrão de inibição por HgCl 1mM. C) Inibição por sulfato de eserina a 1mM. D) controle. E) Inibição por HgCl a 2mM. Regiões inibidas indicadas nas figuras. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), Rr (*R. robustus*) (página 45).

Figura 08. A) Análise de similaridade entre *R. domesticus* (Rd), *R. neivai* (Rn), *R. robustus* (Rr). B) Dendograma construído pelo método de UPGMA mostrando as relações filogenéticas entre as espécies de *Rhodnius*. Os números internos representam os valores de *Bootstrap* baseados em 1000 réplicas. Análises baseadas nas frequências genotípicas das esterases (página 47).

Figura 09. Sistemas enzimáticos em triatomíneos. (A) Fosfoglucomutase (PGM). (B) Malato desidrogenase (MDH). (C) Glicose fosfato isomerase (GPI). Os números abaixo correspondem às amostras das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus* 1-3); Rn (*R. neivai*, 4-6); Rr (*R. robustus*, 7-9); Tb (*T. brasiliensis*, 10-11); Ti (*T. infestans*, 13-15); Tv (*T. vitticeps*, 16-18) (página 50).

Figura 10. Sistemas enzimáticos em triatomíneos. **(A)** α -Gliceroposfato desidrogenase (**GPDH**), **(B)** Enzima málica (**ME**) e (**MDH**). **(C)** Isocitrato desidrogenase (**IDH**). Os números correspondem às amostras das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps* (página 51).

Figura 11. Sistema enzimático da Superóxido dismutase (**SOD**) em triatomíneos. Os números abaixo correspondem às amostras das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps* (página 52).

Figura 12. Zimogramas representativos do sistemas enzimaticos: Fosfoglucomutase (PGM), Malato desidrogenase (MDH), Glucose fosfato isomerase (GPI), α -Glicero fosfato de sódio (GPDH) em *R. domesticus* (Rd); *R. neivai* (Rn); *R. robustus* (Rr), *T. brasiliensis* (Tb), *T. infestans* (Ti) e *T. vitticeps* (Tv). Os números representam os genótipos (página 53).

Figura 13. Zimogramas representativos do sistemas enzimaticos: Enzima málica (ME), Isocitrato desidrogenase (IDH), Superóxido dismutase (SOD) em *R. domesticus* (Rd); *R. neivai* (Rn); *R. robustus* (Rr), *T. brasiliensis* (Tb), *T. infestans* (Ti) e *T. vitticeps* (Tv). Os números representam os genótipos (página 54).

Figura 14. Dendograma construído pelo método de UPGMA mostrando as relações filogenéticas entre as espécies de *Rhodnius* e *Triatoma*. Os números internos representam os valores de *Bootstrap* baseados em 1000 réplicas. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps* (página 56).

Figura 15. (A) e (B) Polimorfismo de tamanho para a região ITS-1 do DNAr de triatomíneos. Os valores em pares de base dos fragmentos amplificados são: Ph 600 pb, Pm 800 pb, Tb 850 pb, Ti 750 pb e Tv 1000 pb, Rd e Rn 300 pb, Rr 250 pb. A letra L designa os marcadores de tamanho molecular (1Kb Ladder, Gibco). **Figura A:** os números correspondem às espécies indicadas na parte superior do gel. Ph (*P. herreni*, 1-2); Pm (*P. megistus*, 3-4); Tb (*T. brasiliensis*, 5); Ti (*T. infestans*, 6); Tv (*T. vitticeps*, 7); Rd (*R. domesticus*, 8); Rn (*R. neivai*, 9); Rr (*R. robustus*, 10) (página 58).

Figura 16. (A) Análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) da região ITS-1 em *Rhodnius*. Os números correspondem às espécies indicadas na parte superior do gel. 1 a 4 Fragmentos amplificados não tratados; 5 a 8 fragmentos amplificados tratados com a endonuclease *Hae* III; 9 a 12 fragmentos amplificados tratados com a endonuclease *Alu* I. **(B)** Digestão do fragmento amplificado correspondente à região ITS-1 pela enzima de restrição *Hae* III em *R. domesticus*; 1-6 DNA tratado com a endonuclease *Hae* III. Letra L designa os marcadores de tamanho molecular (1Kb Ladder, Gibco). Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*) (página 59).

Tabela 1. Frequências genóticas das esterases em espécies dos gêneros *Rhodnius*. Os números 1/1, 1/2, 2/3 etc. representam os genótipos. N = 36 em todas espécies analisadas. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), Rr (*R. robustus*) (página 46).

Tabela 2. Frequências genóticas de vários locos enzimáticos em espécies dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Os números 1/1, 2/2, 3/3 etc. representam os genótipos. N = 30 em todas espécies analisadas. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps* (página 55).

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos Epidemiológicos

A miocardiopatia de Chagas é uma parasitose de natureza endêmica com pronunciada relevância entre as doenças cardíacas na América do Sul. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde cerca de 18 milhões de indivíduos estão infectados pelo *Trypanosoma cruzi* nas áreas endêmicas (Kirchhoff, 1993; Dias 1993; Cardoso *et al.*, 1995; Grijalva *et al.*, 1995; Luquetti 1995; Guhl & Schofield, 1996; Reiche *et al.*, 1996; Altclas *et al.*, 1996; Blangero-Williams *et al.*, 1997; Colli & Alves, 1998; Carvalho *et al.*, 2000).

A doença de Chagas é o único exemplo da história em que o agente causal foi descoberto antes da doença propriamente dita. O médico brasileiro Carlos Chagas estava em missão para controle da malária em Lassance, no Estado de Minas Gerais, quando lhe chamou atenção a abundância de insetos hematófagos (*Panstrongylus megistus*) que abrigavam grandes quantidades de protozoários flagelados em seus intestinos. A inoculação destes protozoários em macacos e outros animais de laboratório provocou o aparecimento dos mesmos no sangue periférico desses animais, mas não acarretou enfermidade. Tempos depois, em 1909, Carlos Chagas detectou o mesmo protozoário no sangue de uma criança, que apresentava febre, adenopatia e hepato-esplenomegalia. Esta foi a primeira associação entre o agente causal e o quadro clínico correspondente. Carlos Chagas denominou o flagelado de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mestre Oswaldo Cruz (Elizari, 1999).

Na infecção inicial pelo *T. cruzi*, denominada fase aguda, somente 3% dos indivíduos afetados apresentam sintomas da doença. Em seguida ocorre a evolução para a fase indeterminada, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas. Após um período entre 10 a 20 anos, 30% dos afetados desenvolvem um quadro de miocardite crônica (Elizari, 1999). Segundo dados de 1991 do Boletim da Organização Mundial de Saúde, cerca de 5,5 milhões de pessoas apresentavam a sintomatologia da doença nas áreas endêmicas, com mais de 50 mil óbitos anuais decorrentes do mal de Chagas (WHO, 1991; Altclas *et al.*, 1996; Galel & Kirchhoff, 1996).

O agente etiológico da doença de Chagas é o *T. cruzi* e os vetores são os insetos hematófagos da ordem Heteroptera, família Reduviidae, mais conhecidos como triatomíneos, devido a denominação da subfamília Triatominae. Os vetores da moléstia de Chagas são popularmente chamados de “barbeiros” ou “chupanças” pelo hábito de picarem a face descoberta de pessoas adormecidas. Entretanto, o motivo mais relevante para a transmissão da doença é o comportamento que estes triatomíneos têm de defecar após a hematofagia, sendo comum a deposição de suas fezes contaminadas com o *T. cruzi* sobre a região facial incluindo os olhos, nariz e boca. Neste momento, as formas infectantes do parasita são transferidas para a circulação do hospedeiro.

Essas formas então penetram as células da pele ou mucosas na região da picada e replicam-se intracelularmente principalmente nos macrófagos. Nestas células, podem escapar do compartimento lisossomal para o citoplasma, onde se multiplicam intensamente. O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo, envolvendo um hospedeiro intermediário invertebrado (vetor) e um

hospedeiro definitivo vertebrado (mamífero). São encontradas três formas distintas deste parasita em seus hospedeiros. A forma infectante é flagelar, denominada de forma tripomastigota, encontrada no sangue periférico dos pacientes e também nas fezes dos barbeiros. A forma epimastigota também é flagelar e está presente no tubo digestivo do vetor. Esta forma é considerada não infectante. Uma pequena porcentagem de parasitas na forma epimastigota evolui para a forma infectante tripomastigota no intestino posterior do inseto e é eliminada nas suas dejeções após repasto. Finalmente, existe a forma ovóide amastigota de replicação intracelular do parasita no hospedeiro vertebrado (Cardoso *et al.*, 1995).

Os triatomíneos nascem sempre livres do *Trypanosoma*. Entretanto, adquirem o parasita em qualquer estágio de sua vida ao sugar o sangue contaminado do homem ou de algum reservatório natural. Esses insetos têm vida relativamente longa (um a dois anos) com evolução de ovo a adulto entre quatro a sete meses, passando por cinco estádios ninfais não alados antes de atingir a fase adulta. O barbeiro tem boa performance biológica em termos de oviposição (cada fêmea oviposita até 200 ovos em sua vida) e capacidade de resistência ao jejum (seis a dez meses).

Os triatomíneos são insetos de hematofagismo quase restrito, mas com ecletismo alimentar que permite sua sobrevivência com qualquer tipo de sangue. Esses insetos têm hábitos noturnos, fotofobia, termotropismo positivo, presença de substâncias anticoagulantes e anestésicas na saliva e hábito quase que obrigatório de evacuar imediatamente após cada repasto sangüíneo. Quando são mecanicamente molestados, exalam um forte odor



causado pela liberação do ácido isobutírico presente em suas glândulas metatorácicas (Schofield, 1979).

Os triatomíneos evoluem e procriam realizando hematofagia desde sua primeira fase de vida até adulto. Este hábito permite um estreito relacionamento com animais reservatórios silvestres e domésticos. Os reservatórios silvestres são representados por marsupiais (gambás, marmotas), desdentados (tatus), roedores (camundongos), carnívoros (irara, furão, cachorro-do-mato, raposas), primatas (macacos e micos) e morcegos de várias espécies. Entre os reservatórios domésticos estão o gato, cachorro, rato, coelho e o próprio homem. É interessante ressaltar que as aves e os vertebrados pecilotérmicos (lagartos, rãs e ofídeos), embora sejam capazes de alimentar os barbeiros, não abrigam o *T. cruzi* em seu organismo, não sendo portanto considerados reservatórios (Dias, 1978; Barreto & Ribeiro, 1979).

Os inimigos naturais dos triatomíneos incluem várias espécies de predadores e parasitas. Entre estes, incluem-se vertebrados como lagartos, roedores e pássaros, artrópodes como aranhas, pseudoescorpiões, formigas, baratas, hemípteros e pequenas vespas, que parasitam os ovos dos triatomíneos. Finalmente alguns nematóides, fungos e bactérias atacam ninfas e adultos de triatomíneos (WHO, 1991).

A doença de Chagas, primitivamente uma endozootia, passou a constituir um problema de saúde humana a partir da domiciliação dos triatomíneos, provavelmente devido à destruição gradativa dos biótipos naturais, que provocou redução significativa da fauna silvestre com conseqüente escassez de alimentos. Também contribuiu para domiciliação o aparecimento de habitações rudimentares, onde os barbeiros encontraram abrigo seguro e alimento



abundante, representado pelo sangue de animais domésticos e do homem. Algumas espécies de triatomíneos adaptaram-se perfeitamente a esses novos ambientes e os colonizaram. Alterada a biocenose, estabeleceu-se um ciclo domiciliar e peri-domiciliar independente do ciclo silvestre. Este fato representa um exemplo típico de sinantropia, isto é, adaptação de um animal ao domicílio humano após a alteração do seu ambiente natural.

Na natureza, a presença do *T. cruzi* não afeta os triatomíneos e mamíferos silvestres naturalmente infectados, o que sugere a existência de um equilíbrio entre as espécies, provavelmente devido ao longo período de adaptação. O aparecimento da doença de Chagas surgiu na população humana devido ao contato do homem com focos naturais e desequilíbrios ecológicos, os quais fizeram com que triatomíneos infectados fossem paulatinamente adaptando-se a habitações humanas de má qualidade.

Os triatomíneos são um grupo homogêneo com relação a biologia e comportamento. Todas as espécies são potenciais vetores do parasita. Epidemiologicamente, entretanto, somente algumas espécies estão estreitamente associadas ao homem e representam um problema de saúde pública. A associação destes insetos com o homem e outros vertebrados é uma característica primária na sua evolução e distribuição. A maior parte das espécies ocorre desde os grandes lagos dos Estados Unidos ao sul da Argentina (Schofield, 1988).

Existem cerca de 129 espécies de triatomíneos (Schofield, 2000). Segundo Silveira (1983), no Brasil, das 44 espécies identificadas, as mais importantes pelo seu grau de contágio, ou seja, espécies primárias são: *Triatoma infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T.*



sordida e *Panstrongylus megistus*. São espécies secundárias: *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma rubrovaria* e *T. vitticeps*.

Certas espécies prevalecem em diferentes regiões, assim, *T. infestans* tem ampla distribuição na América do Sul, *T. brasiliensis* no nordeste do Brasil, *T. dimidiata* no México, América Central, Colômbia, Equador e Peru, *Rhodnius prolixus* em partes da América Central, Venezuela e Colômbia, *Panstrongylus megistus* no Brasil e Paraguai e *T. sordida* no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (Marcilla *et al.*, 2001).

A doença de Chagas é uma das principais endemias da América Latina, sendo superada apenas pela malária. Segundo Guhl & Schofield, (1996) os países endêmicos abrangem: México, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Chile, Uruguai e os países da América Central. Cerca de 53 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (Blagero-Williams *et al.*, 1997).

No Brasil, a doença de Chagas foi responsável por cerca de 16 mil mortes por ano nas duas últimas décadas e entre 10.000 a 20.000 novos casos surgem anualmente (Neves, 1988; Reiche *et al.*, 1996; Colli *et al.*, 1998). Em levantamento realizado por Salles *et al.* (1996) foi estimado que, aproximadamente, 5 milhões de indivíduos estavam infectados pelo *Tripanosoma cruzi*. Outro estudo indicou que a doença de Chagas é encontrada em vários estados: Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás, Distrito Federal, Sergipe, Bahia, Piauí, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso, Alagoas, Mato Grosso do Sul, Acre, Amazonas, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Ceará, Rondônia, Roraima, Espírito Santo, Maranhão (Silveira & Rezende, 1994).



Na Bolívia 1,8 milhão de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi*, a principal causa é a transmissão vetorial do *T. cruzi* por *T. infestans* (Guillen, et al., 1997). No Chile cerca de 700 mil pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi*. Uma séria problemática é que os doadores soro-positivos não são informados de sua condição, sendo apenas suas amostras de sangue descartadas (García et al., 1997).

No México, surgem 44 mil novos casos anualmente. Em estudo realizado na localidade de Oxaca as espécies *T. barberi*, *T. bolivari*, *T. dimidiata*, *T. mazzottii*, *T. nitida*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* e *R. prolixus* foram encontradas em habitats domésticos e peridomicílio, sendo *T. mazzottii* a espécie predominante com alta infecção por *T. cruzi* (Ramsey et al., 2000).

No início da década de 90 houve um marco no combate à doença de Chagas na América do Sul. Os países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) adotaram uma resolução denominada ação para eliminar o *T. infestans*. Foram empregados milhões de dólares no controle do vetor e em testes nos bancos de sangue (Molyneux & Morel, 1998). No Brasil o *T. infestans* praticamente já foi eliminado, a preocupação agora é com outras espécies vetores.

Recentemente, surgiram outros dois blocos de combate à doença de Chagas. Um deles é de iniciativa dos países Andinos envolvendo Colômbia, Equador, Peru e Venezuela. Nestes países, 25 milhões de indivíduos encontram-se em áreas de risco com estimativas entre cinco a seis milhões de pessoas infectadas. O outro bloco foi organizado pelos países da América Central, envolvendo Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá (Oliveira Filho, 1999). Um dos principais vetores nesses

países é a espécie *R. prolixus* sendo *T. dimidiata* e *R. pallescens* também espécies importantes (Ponce, 1999).

Além da propagação da doença de Chagas por dejeções de triatomíneos infectados pelo protozoário, outras vias importantes são a transfusão sangüínea e transmissão congênita. Há ainda relatos de contaminação em transplantes de órgãos. Outra forma de infecção já relatada é a ingestão do protozoário em alimentos contaminados.

Nas zonas urbanas das Américas a transmissão ocorre geralmente via transfusão sangüínea. O risco de um receptor infectar-se via transfusão, a partir de doador chagásico, é de 12,5 a 27%. Estudos indicam que há cerca de 1% de prevalência da doença de Chagas entre os doadores de sangue, porcentagem esta mantida devido aos critérios sorológicos dos hemocentros das grandes cidades (Bonametti *et al.*, 1998).

A doença de Chagas pode se dispersar também por migração de indivíduos chagásicos para regiões não endêmicas, pois estes se transformam em potenciais doadores (Luquetti, 1995). No Brasil, nas últimas três décadas, aumentou o número de pessoas infectadas nas áreas urbanas devido à migração de pessoas das áreas rurais. O Estado de São Paulo, em que a transmissão vetorial da doença de Chagas não ocorre desde 1970, apresenta ainda casos de infecção via transfusão sangüínea (Salles *et al.*, 1996).

Desde meados de 1970, milhões de pessoas provenientes de lugares onde a doença de Chagas é endêmica têm emigrado para os Estados Unidos – particularmente da América Central, onde a prevalência de infecção por *Trypanosoma cruzi* é alta (Kirchhoff, 1993). Estimativas sugerem que há no mínimo 100.000 indivíduos infectados nos Estados Unidos principalmente



devido a imigrantes desses países (Dodd, 1995; Reiche *et al.*, 1996; Rossi & Bestetti, 1995; Galel & Kirchhoff, 1996).

A transmissão congênita atinge entre 1 a 11% das mães chagásicas (Luquetti, 1994). Entretanto, nos países endêmicos, na maioria dos casos as mães e as crianças não são avaliadas quanto à presença da moléstia, mantendo esse tipo de transmissão como uma via importante na propagação da doença (Blanco *et al.*, 2000).

A infecção pelo parasita por via oral pela ingestão de alimentos contaminados por fezes de triatomíneos, tais como cana-de-açúcar, banana, milho e feijão, pode ser possível bem como a ingestão de carne crua de animais infectados (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991). Na região amazônica, há relatos indicando que indivíduos infectaram-se ingerindo suco de açaí, fruto de uma palmeira habitat de espécies de *Rhodnius*. As principais espécies encontradas nestes tipos de palmeiras são *R. robustus* e *R. pictipes* (Valente, 1999). O gênero *Rhodnius* representa mais do que 50% de todos os triatomíneos existentes na floresta amazônica. Outros gêneros têm sido mencionados em baixo número (Sherlock, 1999).

Estudos entomológicos demonstraram que as espécies secundárias de triatomíneos vêm aumentando sua densidade nos domicílios nos últimos anos. Assim, a definição do papel primário ou secundário das diferentes espécies de triatomíneos não pode ser um conceito geral, devendo-se considerar o potencial de domiciliação local da espécie e a pressão que as modificações ambientais possam acarretar ao processo de domiciliação (Dias *et al.*, 1994).

Existe uma preocupação atual com espécies secundárias na transmissão da doença de Chagas, dado que tais espécies em algumas regiões já iniciaram

um ciclo peri-domiciliar e domiciliar. *Triatoma vitticeps*, por exemplo, considerada uma espécie secundária na transmissão da doença de Chagas, já é encontrada em alguns domicílios no Rio de Janeiro (Gonçalves *et al.*, 1998).

Outro exemplo refere-se à espécie *T. pseudomaculata*, distribuída principalmente pelo nordeste brasileiro, considerada uma espécie sem importância epidemiológica por estar associada a ninhos de aves silvestres. Essa espécie já foi encontrada no Ceará em domicílios adjacentes às regiões de caatinga, habitat natural destes insetos. Essa observação mostra a surpreendente capacidade que os triatomíneos têm de se adaptar a novas situações ecológicas (Borges *et al.*, 1999).

A região amazônica, que até recentemente não era considerada uma área endêmica, agora possui um crescente número de casos da doença de Chagas. Nesta região, o *T. cruzi* está iniciando seu ciclo peri-doméstico. A pressão ecológica do desflorestamento permite que triatomíneos se dispersem e iniciem o ciclo domiciliar. Modificações climáticas e decréscimo da quantidade de chuvas tornam o ambiente mais seco, favorecendo a adaptação dos triatomíneos à região. Atualmente, já são relatados casos de ataques de triatomíneos a cortadores de fibra de piaçava (fibra de palmeira), associação destes insetos com animais domésticos e invasão ao domicílio humano (Valente *et al.*, 1999).

A espécie *R. brethesi*, por exemplo, ataca colhedores de piaçava e este ataque a populações humanas se deve principalmente ao desmatamento e destruição da fauna local. No alto do Rio Negro, evidências sorológicas indicaram a infecção com *T. cruzi* como um risco na indústria da piaçava (Barrett, 1988). Estudos sorológicos revelaram 12,5% de sorologia positiva na

população do município de Barcelos, ao norte do Estado do Amazonas (Coura *et al.*, 1994). Ainda na Amazônia, foram registradas espécies secundárias associadas ao peri-domicílio, como *P. geniculatus*, *P. lignarius* e *Eratyrus mucronatus* (Valente *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, o controle de triatomíneos no Brasil e em outros países tem sido realizado. Entretanto, novas espécies podem ocupar as regiões em que outras espécies foram eliminadas. A habilidade dos triatomíneos dispersarem-se em diferentes habitats leva à reinfestação de habitações (Soares & Santoro, 2000). A doença de Chagas está intimamente relacionada à situação sócio-econômica da população e à destruição do habitat natural do vetor da doença. Para um controle efetivo é necessário melhoria de infraestrutura nas habitações. Deve-se ainda conscientizar a população da necessidade de preservação ambiental. Dentre outras medidas, as mais imediatas referem-se ao controle do triatomíneo por inseticidas e seleção rigorosa dos doadores de sangue.

I. 2. Variabilidade Genética

I. 2.1. Abordagem Filogenética

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Todos membros desta subfamília possuem hábito alimentar hematófago. Esse hábito é considerado evolutivamente recente (Schofield, 2000). Para compreensão taxonômica e filogenética dos triatomíneos é interessante ressaltar que a ordem Hemiptera tem representantes espalhados nas regiões tropicais e temperadas. Nessa ordem, mais de 80 mil espécies estão descritas.

Tradicionalmente, Hemiptera está dividida em duas subordens, Homoptera e Heteroptera.

Alguns Homoptera e a maioria dos Heteroptera são adaptados à alimentação de seiva de plantas. Parte dos insetos da subordem Heteroptera são predadores de insetos e de outros invertebrados sugando sua hemolinfa, enquanto outros Heteroptera são adaptados a hematofagia, como ocorre com a subfamília Triatominae (Schofield & Dolling, 1993).

Os Reduviidae são claramente uma família antiga, com registros fósseis sugerindo que as formas predatórias iniciais podem ter se derivado de hemípteros durante o período Permiano/Triássico há 230 milhões de anos. Estas formas precederam os hematófagos, grupo que provavelmente surgiu concomitantemente com os primeiros mamíferos e pássaros durante o Jurássico há 50 milhões de anos. Reduviídeos predadores são amplamente distribuídos e seus registros fósseis foram encontrados em âmbar no Oligoceno e Eoceno (25-65 milhões de anos). Em contraste, parece não haver evidências de registros fósseis das formas hematófagas nesses períodos (Schofield, 2000).

Supõe-se que os primitivos Heteroptera, predadores e hematófagos, tenham evoluído a partir de insetos sugadores de seiva (fitófagos), os Proto-Heteroptera, que sofreram modificações no aparato bucal e digestivo. Os grupos terrestres evoluíram em dois ramos principais, os Pentatomorpha e Cimicomorpha. Estes grupos deram origem às formas predadoras, como Cimicidae e hematófagas como Reduviidae e ainda algumas formas que retornaram ao hábito fitófago. Outras teorias aventam que o aparecimento do primeiro mecanismo alimentar foi o de raspar e filtrar como nos Gerromorpha,



Enicocephalomorpha, alguns Dipsocoromorpha e Nepomorpha. A partir de então, pode ter evoluído o hábito de lacerar ou picar, seguido do fluxo líquido dos Reduvioidea e primitivos Cimicomorpha com hábitos predatórios, dando origem tanto aos fitófagos como aos hematófagos (Carcavallo *et al.*, 1999).

Estas colocações são hipóteses que tentam resolver a filogenia dos Heteroptera. Os triatorníneos, provavelmente, surgiram a partir de grupos predadores. A possibilidade de que a combinação de fatores anatômicos, fisiológicos e etológicos tenha uma origem única dificulta a compreensão quando se considera a combinação de fatores plésio e apomórficos que diferenciam entre si as cinco tribos (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini, e Triatomini) e quatorze gêneros de triatomíneos, como também a distribuição geográfica típica e característica para alguns grupos. Os reduvídeos, no início de sua evolução, possivelmente alimentavam-se de formas moles de invertebrados que pululavam em ninhos de vertebrados, tais como, lagartas, larvas e aranhas. Depois começaram a experimentar a perfuração da pele de pequenos vertebrados. É possível que, numa primeira fase, a hematofagia tenha sido optativa, e enquanto a saliva destes insetos não possuía propriedades anestésicas, os triatomíneos teriam se dirigido a vertebrados recém-nascidos que atacariam como uma forma especial de predação. Posteriormente a esta fase, a partir de adaptações para a hemólise teria começado o processo de hematofagia (Carcavallo *et al.*, 1999).

Para evitar a predação por vertebrados nos ninhos e tocas foram necessárias adaptações comportamentais como comportamento críptico e padrão inverso de atividades, alimentando-se quando o vertebrado está adormecido. Adaptações fisiológicas da função salivar e picada foram



elaboradas para evitar inquietação do vertebrado durante o repasto sanguíneo (Schofield, 2000). A saliva teve que ser modificada para permitir o desenvolvimento do hábito de hematofagia. Nos predadores, a saliva tem efeito proteolítico, característica esta que foi perdida na maioria dos hematófagos para possibilitar a ingestão de sangue pela picada indolor. A hematofagia também requer uma rápida compensação da enorme quantidade de sangue que os Triatominae ingerem, e para tanto o inseto excreta imediatamente grande quantidade de água e sais para diminuir seu peso. Outra adaptação à hematofagia é o processo de ruptura e hemólise dos eritrócitos no início do processo digestivo (Carcavallo *et al.*, 1999).

O comportamento predatório primitivo ainda ocorre em muitas espécies de triatomíneos. Exemplos incluem *T. rubrofasciata* que preda lagartas, *T. rubrovaria* que pode se alimentar de aranhas e bicho da seda, *T. circummaculata* que se alimenta de sangue de vertebrados e hemolinfa de barata. Ninfas jovens de *Eratyrus mucronatus* preferencialmente alimentam-se de invertebrados, enquanto ninfas em estádios mais avançados e adultos alimentam-se de sangue de vertebrados. Um estágio transicional entre predadores e hematófagos pode ser o comportamento canibalista. Existem relatos de ninfas que sugam sangue presente em outras ninfas em colônias de laboratório. Este comportamento de cleptohematofagia ocorre em *Belminus herrei* que obtém sangue de espécies de *Rhodnius* recém-alimentados. Todas estas observações sugerem que o hábito de hematofagia é uma característica recente nos triatomíneos e que ainda estão ocorrendo adaptações a este tipo de comportamento. Os triatomíneos são pouco diferenciados de reduvídeos

predadores, em habitat e forma, o que corrobora que este grupo é ainda recente (Schofield, 2000).

Para mamíferos, a picada por reduvídeos predadores tende a ser muito dolorosa e pode ocasionar a morte, especialmente de pequenos animais, por choque anafilático. O mesmo ocorre no caso de certos triatomíneos. Por exemplo, a picada de *P. geniculatus* em porcos e humanos na Amazônia deixa lesões dolorosas e, no caso de *T. Rubrofasciata*, há relato de morte humana em, pelo menos, um caso. Podemos inferir que muitos triatomíneos estão em processo de adaptação à alimentação hematófaga, reforçando sua recente evolução como inseto hematófago. Em nível fisiológico, há também evidência de adaptação à dieta de sangue de vertebrados, pois insetos hematófagos requerem simbioses que fornecem nutrientes necessários e ausentes nesse tipo de dieta. Enquanto outros insetos hematófagos possuem estoques de simbioses em compartimentos intracelulares específicos, os triatomíneos têm grande quantidade de bactérias (nem todas importantes à sua dieta) vivendo livremente no lúmen do intestino (Schofield, 2000).

Gorla *et al.* (1997) consideram que os triatomíneos tenham origem polifilética e acreditam que a hematofagia surgiu recentemente associada à evolução dos ninhos de vertebrados. A hipótese polifilética implica que os passos adaptativos dos predadores de vida livre à hematofagia podem ter ocorrido várias vezes, não apenas entre diferentes grupos de Reduviidae, mas também entre outros grupos de Hemiptera.

Com esta hipótese pode-se explicar a relação estreita de gêneros e espécies de triatomíneos associados a determinadas espécies de vertebrados. Por exemplo, *Psammolestes* associado a ninhos de pássaros



Dendrocolaptidae, *Cavernicola pilosa barber* à Chiroptera, *Microtriatoma* à biocenose das grandes bromélias epífitas, *P. geniculatus* associados a edentados subterrâneos e entre algumas espécies do complexo *Triatoma protracta* associados à tocas de ratos espinhosos do gênero *Neotoma* (Carcavallo *et al.*, 1999).

A hipótese polifilética também ajuda a explicar a maioria das diferenças anatômicas encontradas entre algumas das tribos e sua notável semelhança com táxons de outras subfamílias de Reduviidae. Por exemplo, *Alberproseniini* possui características morfológicas de Cetherinae e *Psammolestes* possui características anatômicas presentes na subfamília Physoderinae. Entre os estudos mais convincentes, está incluída a descoberta de diferenças fundamentais nos componentes salivares entre os Rhodniini e os Triatomini, assim como diferenças nos padrões sensoriais, sugerindo origens distintas para estas duas tribos. Portanto, a subfamília Triatominae deve ser assumida, mais corretamente, como um agrupamento utilitarista, definida com base nos hábitos hematófagos e adaptações associadas a tal dieta, e não como uma classificação cladística de indivíduos compartilhando uma forma ancestral comum (Carcavallo *et al.*, 1999).

Alguns autores, incluindo Lent & Wygodzinsky (1979) e Usinger (1966), acreditam, no entanto, que os triatomíneos representam um grupo monofilético no sentido que o hábito de hematofagia tenha surgido uma única vez. Gaunt & Miles (2000) também postulam que os triatomíneos possuem origem monofilética, baseados no aparecimento de uma proteína salivar (anti-trombina).



A hipótese monofilética não é somente de difícil sustentação, mas também acarreta problemas no entendimento da distribuição desses insetos, associação com animais fonte de sua alimentação e adaptação a tipos particulares de habitat apresentado pelas espécies. A comparação de parâmetros populacionais, comportamentais, associação com animais e habitat, bem como suas características biogeográficas levam à hipótese de que, provavelmente, os triatomíneos surgiram várias vezes dentro dos Reduviidae e que representam espécies de origem polifilética definida com base em caracteres apomórficos relacionados ao hábito de hematofagia (Schofield, 1988).

O Novo Mundo é claramente o centro de diversidade dos triatomíneos e parece ser a área de origem do grupo. Das aproximadamente 125 espécies de triatomíneos, 105 ocorrem somente nesta região (Schofield, 1988). Dos quatorze gêneros, doze ocorrem exclusivamente nas Américas: *Alberprosenia*, *Belminus*, *Bolboderia*, *Cavernicola*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Parabelmintos*, *Paratriatoma*, *Psammolestes* e *Rhodnius*. Somente dois gêneros, *Linshcosteus* e *Triatoma*, ocorrem no Velho Mundo, sendo que o Gênero *Triatoma* também é encontrado no Novo Mundo (Schofield & Dolling, 1993).

O gênero *Linshcosteus*, com cinco espécies, é confinado à Índia e sete espécies de *Triatoma* estão presentes no sudeste asiático sendo uma das espécies, *T. rubrofasciata*, cosmopolita nos trópicos. Sua ampla distribuição pode ser explicada pelo transporte por navios desde o século XVII até o início do século XX. Esta espécie também está presente no nordeste brasileiro (Schofield, 1988; Schofield & Dolling, 1993). *T. rubrofasciata* é considerada ancestral das outras seis espécies de *Triatoma* presentes no sudeste asiático



(*T. Amicitia*,; *bouvieri*, *cavernicola*, *leopoldi*, *migrans*, *pugasi*, *sinica*) pois compartilham características morfológicas e são todas incluídas no grupo *rubrofasciata*. Outra característica interessante que confirma a hipótese de que *T. rubrofasciata* é uma espécie mais antiga está relacionada à sua picada dolorida, o que é considerado uma característica primitiva (Schofield, 1988).

Em contraste com triatomíneos, Cimicidae e Polychtenidae são hematófagos altamente desenvolvidos com hábitos de ectoparasito e morfologia bastante especializada. A maior parte das 93 espécies de Cimicidae ocorre na África e aquelas que ocorrem nas Américas são, geralmente, espécies associadas aos humanos ou animais domésticos, sugerindo que estas tenham sido exportadas para as Américas no período pós-colombiano. Na África, o nicho ocupado por Cimicidae é muito similar ao dos triatomíneos nas Américas, sugerindo que ambos tenham seguido um rota evolutiva similar (Schofield, 2000).

A quase completa ausência de triatomíneos na África, com exceção de *T. rubrofasciata* levados, provavelmente, por navios a portos africanos, sugere que a evolução de reduvídeos hematófagos na África foi inibida pela evolução de hematófagos Anthocorídeos, agora conhecidos como Cimicidae, que já tinham ocupado os nichos disponíveis. O alto grau de especialização morfológica de Cimicidae sugere que eles se originaram anteriormente aos triatomíneos e que os triatomíneos desenvolveram-se independentemente nas Américas após a separação dos continentes. Esta hipótese é mais aceita em relação à sugestão de que os triatomíneos tenham surgido na África e, subsequente, tornaram-se localmente extintos (Schofield, 2000).



A dispersão dos triatomíneos por meio dos vertebrados foi estudada com base no efeito do fundador, em *R. prolixus*, na América Central. Acredita-se que estes insetos tenham migrado da América do Sul para América Central, transportados por aves. Análises por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e de enzimas nos insetos desta região corroboram esta hipótese, pela observação de limitada variabilidade genética nestes insetos que derivaram recentemente de populações da América do Sul (Dujardin *et al.*, 1998a).

Como já citado, o grupo *rubrofasciata* do sudeste da Ásia, possivelmente é originário de *T. rubrofasciata* do Novo Mundo e transportado pelo homem. Similarmente, o aparecimento de *Rhodnius prolixus* no México é associado com a migração de vertebrados (Schofileld, 1988). A expansão e distribuição de *T. infestans*, por exemplo, está intimamente relacionada à atividade humana (Schofileld, 1988). Essa espécie é endêmica no território boliviano e sofreu dispersão por ação do homem, sua invasão domiciliar obedeceu a um mecanismo oportunista propiciado por estímulos de abrigo e alimentação (Forattini, 1980).

Dentro do grupo dos triatomíneos, as tribos Rhodniini, Cavernicolini, Bolnoderini e Alberproseniini constituem grupos monofiléticos, enquanto a tribo Triatomini é considerada um grupo polifilético e possui ambientes rochosos como seu principal habitat. As espécies de *Panstrongylus* são reconhecidas como monofiléticas e parecem, na maioria dos casos, estar envolvidas com habitats próximos ao solo e serrapilheira, em contraste com as espécies de *Rhodnius* que são em sua maioria associadas à copas de árvores e ninhos de



aves. A morfologia distinta dos gêneros *Rhodnius* e *Panstrongylus* também indica a origem de ancestrais predadores distintos (Schofield, 1988).

É mais provável que os grupos de triatomíneos tenham se originado de ancestrais diferentes, do que hipotetizar que um único ancestral tenha dado origem a todos os complexos de espécies e gêneros que ocupam diferentes habitats e possuem distintas estratégias reprodutivas e comportamentais. (Schofield, 1988).

A origem monofilética dentro dos triatomíneos é, entretanto, bem compreendida no gênero *Rhodnius*. Este grupo de espécies possui características similares e seria originado de uma espécie ancestral, que, segundo estudos, evoluiu a partir da região amazônica tendo, posteriormente, dispersado-se para outras áreas. A similaridade em *Rhodnius* é observada entre espécies classificadas de forma equivocada, devido a sua estreita similaridade morfológica. *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus* são agrupadas como complexo *prolixus*, sendo *robustus* dificilmente diferenciado de *prolixus*. Populações de *robustus* do Peru são completamente inter-férteis com populações domésticas de *prolixus* de Honduras, Colômbia e Venezuela (Schofield & Dujardin, 1999).

Atualmente existem 13 espécies de *Rhodnius* descritas (*R. brethesi*, *R. dalessandroi*, *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. paraensis*, *R. pictipes*, *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. stali*). Estas espécies estão agrupadas na tribo *Rhodniini*, juntamente com o gênero *Psammolestes*, sendo consideradas monofiléticas (Schofield & Dujardin, 1999).



A classificação de Rhodiniini como uma tribo monofilética, leva em consideração características presentes no gênero *Rhodnius* e não compartilhadas com outros triatomíneos, tais como, inserção apical da antena, forma do corpo, calosidades pós-oculares, características da genitália masculina, arquitetura da superfície do ovo e a presença de nitroforinas nas glândulas salivares, dando-lhes coloração avermelhada. Além destas características, os gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes* são primariamente espécies arbóreas em contraste com os hábitos terrestres da maior parte dos outros triatomíneos (Schofield & Dujardin, 1999).

É postulado que o gênero *Rhodnius* surgiu durante o quaternário na região Amazônica. Schofield & Dujardin (1999) hipotetizaram que a espécie mais próxima do ancestral reduvídeo é a espécie *R. pictipes*. Esta espécie habita uma variedade de palmeiras e bromélias e tem uma extensa distribuição geográfica dentro do gênero, além de compartilhar características da genitália do macho (presença de falosoma) com outros triatomíneos e reduvídeos predadores. Outras espécies de *Rhodnius* da região Amazônica tendem a ser mais altamente especializadas e podem ser consideradas derivadas de *pictipes*.

Atualmente, a hipótese mais aceita, é que os triatomíneos representam um grupo polifilético definido com base em seus caracteres apomórficos convergentes relacionados à hematofagia e que este hábito tenha surgido várias vezes dentro dos Reduviidae. Os triatomíneos têm ampla capacidade de adaptação a diferentes habitats e expansão constante por animais ou pelo próprio homem. Sua origem é provavelmente polifilética, originados de ancestrais reduvídeos predadores. A evolução polifilética é corroborada por

diversos estudos realizados nas tribos Rhodiniini e Triatomini. Análises de seqüências de DNA mitocondrial e ribossômico, análise de polimorfismo de tamanho de determinadas regiões do DNAr, estudos enzimáticos, análises morfológicas e taxonômicas, estudos ecológicos, todos levam à teoria de evolução polifilética dos triatomíneos. Portanto, a subfamília Triatominae pode ser definida como um agrupamento baseado no hábito hematófago, tendo como ancestrais reduvídeos predadores espalhados por diversas regiões do mundo.

I. 2.2. Abordagem Bioquímica e Molecular

Marcadores moleculares e proteicos contribuem e ampliam o campo de estudo da Genética. Eles apresentam padrões de loco único ou multi-locos, e sua análise discrimina níveis populacionais e inter-específicos. Marcadores de DNA, especialmente aqueles de regiões não codificantes, são mais provavelmente neutros do que marcadores aloenzimáticos (Loxdale & Lushai, 1998).

Os triatomíneos, atualmente, são analisados por técnicas moleculares e enzimáticas. Estes insetos podem ser provenientes de ambiente silvestre ou de populações mantidas em laboratório. A utilização de populações mantidas em laboratório está sujeita a alterações estocásticas na freqüência de alguns alelos. Considerando, uma colônia de insetos, fundada com amostra representativa da variabilidade genética natural, as oscilações das freqüências alélicas podem representar esta variabilidade. Esse fato, se deve, ao longo período entre uma geração e outra nos triatomíneos, um ano em média.

Quando insetos são mantidos sob condições de laboratório, amostras de insetos silvestres podem tornar-se não representativas de suas populações na

natureza. Redução do tamanho populacional, efeito de endocruzamento, efeito do fundador e a deriva genética são fatores que podem afetar a diversidade genética. Nas condições laboratoriais, a seleção direcional, devido às condições uniformes do ambiente laboratorial, pode causar perda de variabilidade genética, assim, alguns genótipos encontrados no ambiente silvestre podem não ser favorecidos em condições laboratoriais.

Em 1968, Kimura postulou que a maioria das mudanças moleculares na evolução é devida à fixação aleatória de mutações neutras, o que se tornou conhecido como Teoria Neutralista da Evolução. Essa teoria afirma que, ao nível molecular, a maioria das mudanças evolutivas e muito da variabilidade intraespecífica não são causadas por seleção positiva de alelos vantajosos ou por seleção balanceada, mas por deriva genética aleatória de alelos mutantes que são seletivamente neutros. Neutralidade, neste sentido, significa que o destino dos alelos é determinado em grande parte pela deriva genética. Em outras palavras, a seleção pode operar, mas sua intensidade é demasiadamente fraca para compensar as influências do acaso (Li & Graur, 1991).

De acordo com a Teoria da Neutralidade, a frequência dos alelos é determinada por regras puramente estocásticas. Em um dado espaço de tempo, alguns locos possuirão alelos com frequências entre 0% e 100%. A essência da disputa entre neutralistas e selecionistas está relacionada à distribuição dos valores adaptativos dos alelos mutantes. Ambas teorias concordam que a maior parte das novas mutações é deletéria e que estas mutações são rapidamente removidas das populações, não contribuindo nem para a taxa de substituição nem para a quantidade de polimorfismo dentro de



populações. Entretanto, enquanto os selecionistas mantêm que poucas mutações são seletivamente neutras, os neutralistas argumentam que a maior parte das mutações não deletérias são efetivamente neutras (Li & Graur, 1991).

A fixação de alelos distintos pode funcionar como fator diagnóstico entre as diferentes espécies e, provavelmente, é oriunda do acúmulo de mutações, deriva genética e de divergência na ancestralidade das espécies (Futuyma, 1986). Estudos em diferentes espécies de triatomíneos quanto a esse aspecto têm revelado dados de sua evolução e filogenia, permitindo a distribuição destes insetos em diferentes tribos e gêneros e complexos específicos.

Nos complexos de espécies ou grupos de morfologia similar, existem espécies geneticamente interférteis as quais taxonomicamente são consideradas espécies válidas. O conceito de isolamento reprodutivo deve ser considerado com base em barreiras geográficas e ecológicas que tornam impossível o cruzamento de populações que não são geneticamente incompatíveis. Um notável exemplo pode ser observado entre *T. infestans* e *T. platensis*, espécies facilmente separáveis em nível morfológico e molecular. Entretanto, quando experimentalmente colocadas em contato, estas espécies produzem prole fértil por muitas gerações. No ambiente natural não há uma barreira geográfica entre estas espécies, a barreira reprodutiva entre elas é ecológica, pois *T. infestans* é totalmente domiciliar, enquanto *T. platensis* é silvestre e raramente se aproxima de habitações humanas, sendo algumas vezes encontrada no peridomicílio. Nesse ambiente, tais espécies formam híbridos naturais férteis. Os estudos taxonômicos devem considerar estes genótipos não somente resultantes de combinações parentais, mas sim resultados adaptativos de condições genéticas básicas à condições ambientais



paratípicas, as quais podem explicar aspectos sobre diversidade e evolução (Carcavallo *et al.*, 1999).

Espécies de Heteroptera, incluindo membros da família Triatominae, têm sido analisadas geneticamente com relação a vários sistemas enzimáticos (Dujardin & Tibayrenc, 1985; Dujardin *et al.*, 1987; Dujardin *et al.* 1998 a,b; Frías & Kattan 1989; García *et al.*, 1995; Harry *et al.* 1992). Um destes estudos, em *T. infestans*, sugeriu a ocorrência de efeito do fundador durante a expansão das populações (Dujardin & Tibayrenc, 1985). Nenhuma diferença significativa nos fenótipos enzimáticos foi observada entre populações silvestres e domiciliares desta espécie (Dujardin *et al.*, 1987).

Dórea *et al.* (1982) analisaram o padrão enzimático em ninfas de 5º estágio e adultos de *Panstrongylus megistus* Burmeister e observaram algumas diferenças no padrão eletroforético, embora todos os 20 locos estudados fossem considerados comuns. Fontan & Zerba (1984) analisaram a atividade esterásica em *T. infestans* quanto a presença de atividade na epiderme do inseto e constataram que a atividade desta enzima depende da idade e estado de jejum do inseto. Outro estudo sobre o padrão de esterases de *T. infestans* revelou a presença de seis bandas esterásicas, não sendo detectada variabilidade genética entre as diferentes linhagens utilizadas (Tavares *et al.*, 1998).

O monomorfismo é uma característica bastante comum entre triatomíneos (Pereira *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 1999; Brenière *et al.*, 1997). Populações de *T. infestans* da Bolívia e do Peru foram analisadas quanto a vários locos enzimáticos e constatou-se que dos doze sistemas de enzimas analisados três foram polimórficos e os restantes monomórficos (Dujardin *et al.*, 1998b). Frias



& Kattan (1989), relataram que populações de *Triatoma infestans* domiciliares mostraram menos polimorfismos enzimáticos do que populações de *T. spinolai* silvestres. Lopez & Moreno (1995) analisaram a variabilidade genética em 10 sistemas enzimáticos em populações silvestres, domiciliares e peri-domiciliares de *Rhodnius prolixus* e *R. pallescens*, verificando maior variabilidade genética em habitats silvestres quando comparados com habitats domiciliares em ambas as espécies.

A tendência à fixação de determinados alelos em espécies distintas pode ser observada em estudos presentes na literatura (Panzera, *et al.* 1997; Noireau, 1998). As espécies *T. infestans* e *T. Spinolai*, analisadas para 12 diferentes sistemas enzimáticos, revelaram alto grau de monomorfismo, na maioria dos casos alelos distintos são fixados em cada espécie (Frías & Kattan, 1989).

A variabilidade genética em triatomíneos também pode ser analisada com uso de marcadores moleculares. Por exemplo, os espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) do DNA ribossômico são ferramentas importantes para resolver associações de táxons estreitamente relacionados. Os ribossomos são o principal componente das células envolvidos na tradução de RNA em proteínas.

Todos os ribossomos são constituídos de 2 subunidades, cada uma contendo RNAr e moléculas de proteínas. RNAs ribossomais são freqüentemente utilizados para inferências evolutivas entre espécies, porque são universalmente presentes em todas as formas de vida que possuem um sistema sintetizante de proteínas. O RNAs ribossomais contém regiões que são conservadas e outras variáveis.



Em eucariotos, os genes codificantes para os RNAr 18S, 5,8S e 28S são arranjados em “clusters” repetidos nas regiões organizadoras do nucléolo. Na maior parte dos animais, existe de 100 a 500 cópias do DNAr no genoma nuclear. Cada unidade repetitiva é composta de uma região promotora conhecida como Espaçador Externo Transcrito (ETS), uma região codificante para o RNAr 18S, uma região espaçadora interna não codificante (ITS-1), uma região codificante para o RNAr 5,8 S, uma segunda região espaçadora interna não codificante (ITS-2), a região codificante para o RNAr 28S e um segmento intergênico não transcrito (IGS), o qual separa as unidades de transcrição (Roy, 1994; Polanco *et al.*, 1998).

O DNA ribossômico é freqüentemente utilizado para se inferir relações evolutivas entre espécies. Em geral alto grau de polimorfismo tem sido encontrado nas suas regiões não codificantes (ITS-1, ITS-2 e IGS), sendo que a mais variável das unidades de repetição é o espaço intergênico IGS (Hoy, 1994). Segundo Fenton (1994) as regiões não codificantes do DNAr fornecem meios para investigação de variabilidade intra e inter específica.

Muitos organismos têm sido analisados e comparados com base nas regiões espaçadoras do DNA ribossômico (Townson *et al.*, 1994; Hiatt *et al.*, 1995; Petersen & Vrain, 1996; Bunting, 1996; Miller, 1996; Tyrrel, 1997; Petersen *et al.*, 1997; Coleman & Mai, 1997; White, 1998; Polanco *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1994; Baffi & Ceron, 2002, *in press*). Alta variabilidade genética também tem sido analisada na região IGS do DNA ribossômico (Black *et al.*, 1989; De Merida, 1995; Cornel *et al.*, 1997; Wu & Fallon, 1998).

Nos triatomíneos, análises das regiões ITS-2 e 18S do DNAr indicaram que a divergência entre as tribos *Triatomini* e *Rhodniini* possivelmente ocorreu



no baixo Terciário e que a tribo Triatomini teve origem polifilética. (Bargues *et al.*, 2000). A variação genética em triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* também foi investigada pela amplificação e sequenciamento de 400 pb de um gene mitocondrial (RNA ribossômico 16S). A variação da região foi analisada pela técnica de SSCP (*single strand conformational polymorphism analysis*) e sequenciamento direto. Análises filogenéticas revelaram que os gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* foram mais estreitamente relacionados entre si do que quando comparados com o gênero *Rhodnius* (Stothard *et al.*, 1998).

Estudos de sequenciamento de genes do RNA ribossômico mitocondrial e citocromo B agruparam *Psammolestes coreodes* com as espécies *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus*. Estas três espécies de *Rhodnius*, embora morfologicamente semelhantes, foram diferenciadas pelo sequenciamento destes genes mitocondriais. A análise também sugeriu dentro da tribo triatomini maior proximidade filogenética entre *T. infestans*, *T. sordida*, *T. dimidiata* e *T. pallidipennis* (Lyman, 1999).

Comparações da sequência de DNA do gene mitocondrial citocromo B também foram aplicadas em nove populações de *T. infestans* e sua relação com *T. melanosoma* e *T. brasiliensis*. *T. infestans* e *T. melanosoma* foram comparadas por morfometria, enzimas, citogenética e cruzamento recíproco. Entretanto, não foram encontradas diferenças que pudessem distinguir essas duas espécies. Populações de *T. infestans* apresentaram quatro haplótipos que puderam ser separados em dois grupos, um formado por amostras da Bolívia e outro formado por amostras da Argentina e Brasil. Variações intra-populacionais não foram observadas. Populações silvestres e domésticas de *T.*

infestans da Bolívia apresentaram-se geneticamente idênticas (Monteiro *et al.*, 1999).

Os triatomíneos são insetos de importância epidemiológica. O estudo da biologia deste grupo torna-se significativo, na medida em que revela dados genéticos, evolutivos e comportamentais, propiciando melhor conhecimento sobre os mesmos e permitindo prevenção e controle da doença de Chagas. Dados que informam sobre a distinção entre espécies silvestres de baixo risco e espécies domiciliares nocivas, hábitos e horários de hematofagia, capacidade reprodutiva, resistência a inseticidas, ciclo evolutivo, reservatórios domésticos e silvestres do agente etiológico, bem como, as inter-relações entre espécies e gêneros estudadas no contexto evolutivo podem ser importantes ferramentas no controle da moléstia de Chagas.



II. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi aprofundar os estudos sobre a variabilidade genética em triatomíneos e estabelecer suas relações filogenéticas e evolutivas. Para tal objetivo foram utilizadas, no total, oito espécies de triatomíneos pertencentes a três gêneros distintos, procedendo-se aos seguintes estudos:

a) Análise de seis espécies de triatomíneos (*Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*) empregando os sistemas enzimáticos **ME** - Enzima málica (**EC 1.1.1.40.**), **MDH** - Malato desidrogenase (**EC 1.1.1.37.**), **GPI** - Glicose fosfato isomerase (**EC 5.3.1.9.**), **IDH** - Isocitrato desidrogenase (**EC 1.1.1.42.**), **PGM** - Fosfoglucomutase (**EC 5.4.2.2.**), **GPDH** - α -Glicerofosfato-desidrogenase (**EC 3.4.11.1.**) e **SOD** - Superóxido dismutase (**EC 1.15.1.1.**);

b) Análise do padrão de Esterases (Carboxilesterases **E.C.3.1.1.1** e Colinesterases, **E.C. 3.1.1.8**) nas três espécies de *Rhodnius* visando-se a comparação entre espécies;

c) Estudo da variabilidade molecular da região intergênica ITS-1 do DNA ribossômico pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) comparando-se espécies dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (*P. megistus* e *P. herreni*).



III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Insetos

Os triatomíneos analisados foram *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *Panstrongylus megistus* e *P. herreni* pertencentes a subordem Heteroptera, sub-família Triatominae e família Reduviidae (Lent et al., 1979; Manna, 1995). Os insetos foram obtidos do Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Professor Doutor José Maria Soares Barata.

III.2. Padrão de Esterases em Espécies do Gênero *Rhodnius*

Espécies e Amostras

As espécies analisadas foram *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*. Analisaram-se 36 insetos de cada espécie, independente do sexo. Os insetos foram dissecados e a região torácica, cabeça e órgãos do abdome (túbulos de Malpighi, testículos e glândulas acessórias) retirados e mantidos a -20°C em tubos *ependorf*. As amostras foram maceradas em tampão Tris-HCl, 0,1M, pH 6,8 com adição de 13% de glicerol e 0,5 mL de azul de bromofenol a 0,1%.

Análise Eletroforética de Esterases

O procedimento foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida pelo método de Laemmili (1970), omitindo-se a adição de SDS. Os géis de separação foram polimerizados em tampão 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 na concentração de 12%. Os géis de



empilhamento a 4% foram preparados em 0,12M Tris-HCl, pH 6,8. O tempo de corrida foi de aproximadamente 5 horas a 200 V. Após a eletroforese, os géis foram pré-incubados em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2, por 20 min. Em seguida, foram corados utilizando-se o α e β naftil acetatos como substratos nas concentrações de 40 μ g e 30 μ g, previamente dissolvidos em 2 mL de acetona e coloração por *Fast Blue RR* 120 μ g em um volume final de 100mL no tampão fosfato 0,1 M pH 6,2.

Após a coloração, os géis foram descorados e secados segundo a metodologia de Ceron *et al.* (1992).

Teste com Inibidores

Para realização dos testes de inibição foram utilizados os inibidores sulfato de eserina, malathion, fluoreto de sódio, cloreto de mercúrio, pCMB (p-cloromercuribenzoato) e iodoacetamida. Amostras eram divididas em duas ou mais partes para realização dos controles e experimentos. O inibidor sulfato de eserina foi utilizado na concentração de 1mM e 1,5 mM. Cloreto de mercúrio e iodoacetamida foram aplicados a 1 e 2mM. Para o inibidor pCMB utilizaram-se as concentrações de 1, 2 e 4 mM e o fluoreto de sódio à 5mM. Os compostos foram dissolvidos diretamente no tampão de pré-incubação e na solução corante para esterases. O pCMB foi pré-dissolvido em NaOH 0,2 N. A iodoacetamida foi adicionada previamente nas amostras.

Estes experimentos foram realizados objetivando-se identificar as Carboxilesterases (EC 3.1.1.1.) inibidas por organofosforados, Colinesterases (EC 3.1.1.8.) inibidas por organofosforados e sulfato de eserina, Arilesterases (EC 3.1.1.2.) inibidas por reagentes

sufidrílicos e compostos mercuriais e Acetilesterases (EC 3.1.1.1.6.) não inibidas por drogas rotineiramente utilizadas para classificação das esterases.

III.3. Análise dos Sistemas Enzimáticos ME, MDH, GPI, IDH, PGM, GPD, SOD em Espécies dos Gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*

Espécies e Amostras

Foram analisados 30 insetos , sem distinção de sexo, das espécies analisadas *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*. Os insetos foram dissecados e a região torácica, cabeça e órgãos do abdome (túbulos de Malpighi, testículos e glândulas acessórias) foram retirados e mantidos a 20°C negativos em tubos *ependorf*. As amostras foram maceradas em 2-mercaptoetanol a 2% um dia antes dos experimentos e mantidas em -20°C até o momento da aplicação. Ensaio preliminares mostraram que o este armazenamento prévio não interfere nos resultados dos experimentos.

Gel de Amido

Os experimentos foram realizados por eletroforese em gel de amido a 14%. Os géis foram solidificados em tampão apropriado conforme o sistema enzimático analisado, a eletroforese foi realizada a aproximadamente 200V, a 4°C durante a corrida. Após a eletroforese os géis foram fatiados em três partes para análise.

Colorações dos Sistemas Enzimáticos:

As colorações foram realizadas a 37°C, em estufa, até o aparecimento das bandas. Solução a 2% de ágar foi aplicada sobre as fatias do gel de amido dobrando-se o volume da solução corante e permitindo a gelificação do mesma. As



concentrações das soluções foram: Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; NaOH 10N; PMS (Sulfato de N-metildibenzopirazina) 5mg/mL; MTT (Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) 5mg/mL; $MgCl_2$ 0,2 M; NADP(β -nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato) 5mg/mL; NAD (β -Nicotinamida Adenina Dinucleotideo) 10 mg/mL.

Abaixo são apresentadas as colorações específicas para cada enzima:

1) ME- Enzima málica (**EC 1.1.1.40.**), 15mL Tris-HCl, 125mg de ácido málico, pH 8,0 com NaOH, 1mL NAD, ágar 10mL. **2) MDH** - Malato desidrogenase (**EC 1.1.1.37.**) 125 mg ácido málico, 15mL de tris-HCl, pH 8.0 com NaOH, 1 mL de NAD, 0,5 mL de PMS, 0,8 mL de MTT, ágar. **3) GPI** - Glicose fosfato isomerase (**EC 5.3.1.9.**) 15 mL tris-HCl, 1 mL NADP, 1 $MgCl_2$ 0,8 mL de MTT, 0,4mL de PMS, 10 unidades de Glicose-6-fosfato desidrogenase, ágar. **4) IDH** -Isocitrato desidrogenase (**EC 1.1.1.42.**) 12 mL de Tris-HCl, 20 mg de DL-ácido isocitrato, 1 mL de NADP, 0,7 mL de MTT, 0,4 mL de PMS, ágar. **5) PGM** -fosfoglicomutase ou α -D-glicose-1-fosfato fosfotransferase (**EC 5.4.2.2.**) 10 mL de Tris-HCl, 1 mL de 20 mg de α -D-glicose 1-fosfato, 1m de $MgCl_2$, 1 mL de NADP, 0,4 mL de PMS, 0,7 mL de MTT, 5 unidades de Glicose-6-fosfato desidrogenase, ágar. **6) GPDH** - α -glicerofosfato-desidrogenase (**E C 1.1.1.8.**) 15 mL de Tris-HCl, 120 mg de DL- α -Glicerofosfato sal dissódico, 1 mL de NAD, 0,8 mL de MTT, 0,5 mL de PMS, ágar. **07) SOD** -Superóxido Dismutase (**EC 1.15.1.1.**)10 mL de Tris-HCl, 10 mg de EDTA (sal dissódico) , 1,5 mL de MTT, 0,4 mL de PMS, ágar.

Tampões do Gel e da Cuba

SOD (EC 1.15.1.1.)

Gel- Ácido DL- α -Amino- β -imidazol propiônico, 5,0 mM pH 6.0;



Cuba - Tampão Tris-Citrato pH 7,5, Tris-0,15 M, Ácido cítrico 0,05M.

Sistema enzimático: **GPI (EC 5.3.1.9.)**

Gel- tampão Tris-Citrato pH 8,0, Tris 0,017M, Ácido cítrico 0,0023M;

Cuba- Tampão Tris-Citrato pH 8,0, Tris 0,25M, Ácido cítrico 0,057M

Sistemas enzimáticos: **PGM (EC 5.4.2.2.); MDH (EC 1.1.1.37.); ME (EC 1.1.1.40.); IDH (EC 1.1.1.42.); GPD (E C 1.1.1.8.)**

Cuba- Tampão TEMM, pH 7,4, Tris 0,1M, $MgCl_2$ 0,01M, Anidrido Maleico 0,1M, EDTA (Sal dissódico) 0,01M, Gel- o mesmo tampão diluído 10X.

III.4. Análises Filogenéticas

A análise de similaridade foi realizada pelo programa MINITAB for Windows, Release 10.1, os cálculos foram efetuados através de análise de aglomerados, pelo método de ligação simples (single linkage). A análise filogenética foi efetuada com o programa Paup 4.0 b10, utilizando-se UPGMA (*Unweighted Par Group Using Arithmetic Averages*) e *Bootstrap* de 1000 réplicas. Tanto os valores de UPGMA como os de análise de similaridade foram baseados nas frequências genotípicas das espécies estudadas.

III.5. Análise da Região Intergênica da DNA Ribossômico (ITS-1) em Espécies dos Gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*

Espécies e Amostras

As espécies analisadas neste trabalho foram *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *Panstrongylus megistus* e *P. herreni*. Foram analisados 28 machos de cada espécie exceto para o gênero

Panstrongylus em que foram analisados 10 indivíduos. Os insetos foram dissecados, os testículos retirados e mantidos a -20°C em tubos *ependorf* para análise.

Extração de DNA (Cocciolone & Cone 1993 com modificações)

As amostras foram maceradas em 500 μL tampão de extração (0,35M NaCl, Tris-HCl 50mM pH 7,6; EDTA 50mM, Uréia 7M e N-lauroilsarcosina 2%). Posteriormente foram incubadas por 60 min, a 37°C , com adição de 2 μL de proteinase K (5mg/mL). Em seguida, adicionou-se 500 μL fenol/clorofórmio (1:1), agitou-se manualmente por 5 min e a solução foi incubada por 40 min a 37°C . O material foi centrifugado por 15 minutos a 14×10^3 rpm, a fase aquosa foi removida para novo tubo *ependorf* e o DNA precipitado com um volume de 40 μL de acetato de sódio 3M pH 5,0 mais 400 μL de etanol 70%. Após nova centrifugação, sob mesma rotação, o precipitado de DNA foi lavado com 500 μL de etanol 70%, seco em estufa a 37°C , por 30 minutos, e diluído em tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1mM). O DNA, assim preparado, foi eluído por 24 horas. Finalmente, acrescentou-se 1 μL de RNase (10mg/mL), a solução foi ressuspendida e incubada por 40 min, a 37°C e por 15 min adicionais a 65°C para inativação da RNase.

Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação *in vitro* foi realizada com volume final de 25 μL de reação contendo 1,25 unidades de *taq* DNA polimerase (Gibco BRL), 1X tampão de PCR (Gibco BRL), 200 μM dNTPs, 1,5 mM MgCl_2 e 2 μL (33 nmoles) da mistura contendo *primers* para a região intergênica ITS-1 do rDNA (16,5 nmoles para cada *primer*). As condições de ciclo foram: 2 min, a 95°C (denaturação); 36 ciclos sendo: 1 min, a 95°C (denaturação), 1min 49°C (anelamento) e 1 min, a 72°C (polimerização) e extensão adicional a 72°C , por 4 minutos ao final. Os *primers* utilizados foram 5'CGACGCAAGAAGTAGCTG (sense) e 5'



CGTAACAAGGTTTCCGTAGG (anti-sense). Estas seqüências foram originalmente desenvolvidas pelo Professor Doutor J. B. Clark do Departamento de Biologia Evolutiva da Universidade do Arizona em Tucson, Estados Unidos, para estudo da região ITS-1 em espécies de *Drosophila* (J. B. Clark, comunicação pessoal ao Prof. Ceron).

Análise Eletroforética da Região Amplificada

O amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. O gel foi preparado com tampão TAE 1X (Tris base, ácido acético e EDTA 0,5M). A coloração foi realizada com brometo de etídeo (solução 10mg/mL) 10 μ l em 100mL de tampão. O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado comparando-os com os marcadores moleculares da GIBCO (1Kb Ladder). A observação dos resultados foi realizada sob a luz ultra-violeta e o registro das imagens em câmara fotográfica Polaroid.

Digestão com Endonucleases de Restrição

Foram utilizadas as endonucleases de restrição *Alu* I e *Hae* III (GIBCO BRL) sendo aplicadas 10 U de enzima para cada amostra. Nas condições de reação a concentração final das soluções tampão de digestão foram: *Alu* I (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM Mg Cl_2) e *Hae* III (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM Mg Cl_2 , 50 mM NaCl) para um volume final de 15 μ l. Os ensaios foram realizados *overnight* a 37°C. Os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 5%, coloração com brometo de etídeo e observação sob luz ultra violeta.



IV. RESULTADOS

IV.1. Análise de Locos Esterásicos em Espécies do Gênero *Rhodnius*

A classificação das esterases foi baseada nos resultados de inibição, posição de migração, afinidade por diferentes substratos e aspecto das bandas. Observou-se a presença de 3 locos gênicos principais codificantes para esterases nas espécies de *Rhodnius* (Figura 1 a Figura 4). Bandas duplas encontradas em 100% dos insetos analisados, nos locos Est 1 e Est 3, foram consideradas como único alelo devido ao provável efeito de enzimas secundárias.

Os ensaios realizados com pCMB, iodoacetamida e fluoreto de sódio revelaram ausência de inibição indicando que as esterases analisadas não pertencem ao grupo das Arilesterases (Figuras 05 A-F e 06 B). A aplicação de sulfato de eserina e Malathion permitiram identificar os locos Est 1, Est 2 e Est 3 como colinesterases e o loco Est 4 inibido somente pelo malathion foi classificado como carboxilesterase (Figuras 06 C e D e 07C). O cloreto de mercúrio não provocou inibição a 1mM e inibiu os locos de colinesterases na concentração de 2mM (Figura 07 B e E).

As frequências genótípicas (Tabela 1) foram utilizadas para a análise do índice de similaridade entre as espécies (Figura 08A) e UPGMA com *Bootstrap* de 1000 réplicas (Figura 08B). Estas análises indicam que as espécies *R. domesticus* e *R. robustus* são mais próximas entre si quando comparadas à *R. neivai*.



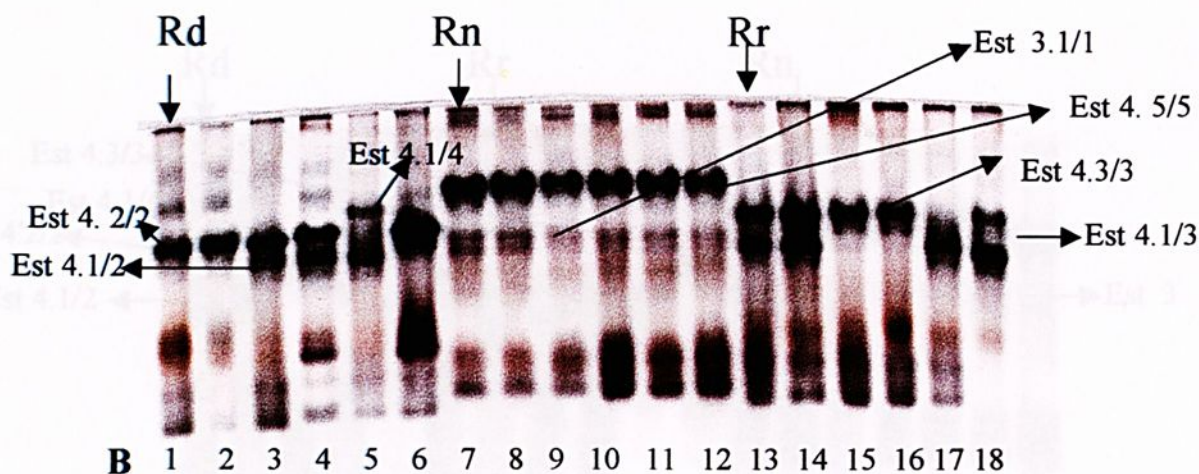
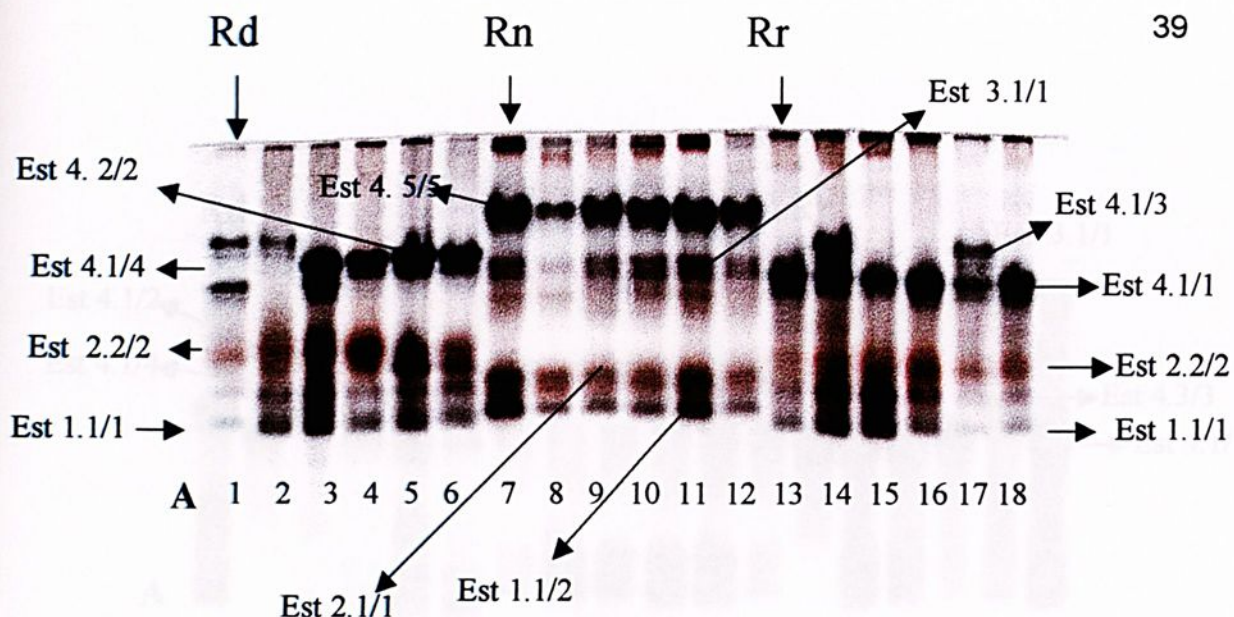


Figura 01. (A) e (B) Padrões esterásicos comparativos em espécies do gênero *Rhodnius*. As setas indicam diferentes genótipos. Os números abaixo correspondem à amostras individuais das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*, 1-6); Rn (*R. neivai* 7-12); Rr (*R. robustus* 13-18). As bandas coradas em preto denotam atividade de α -esterase e as bandas coradas em vermelho, de β -esterase.

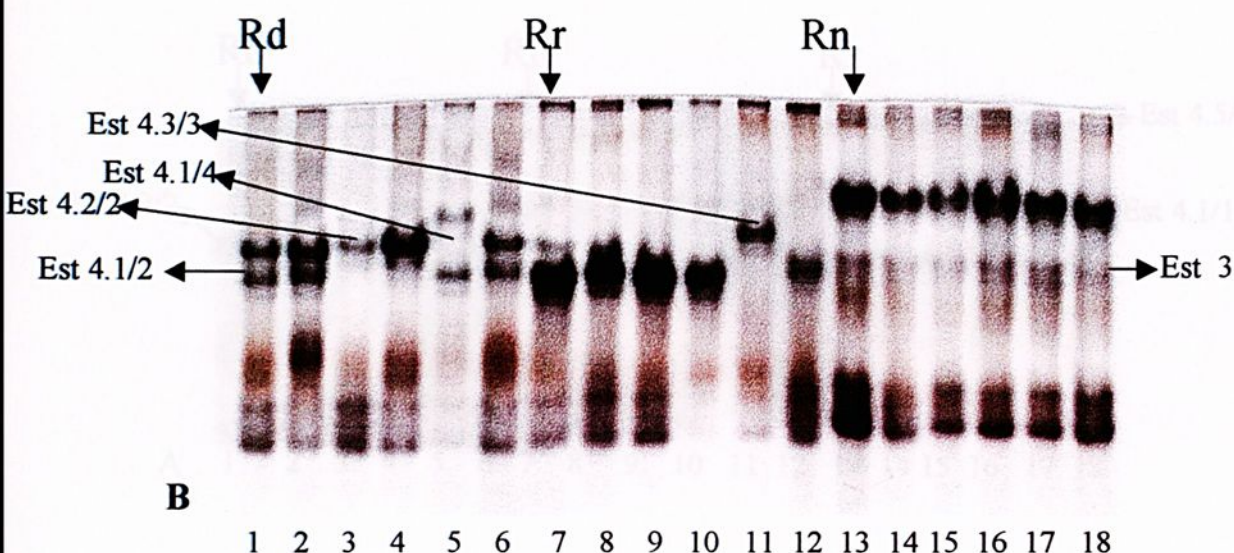
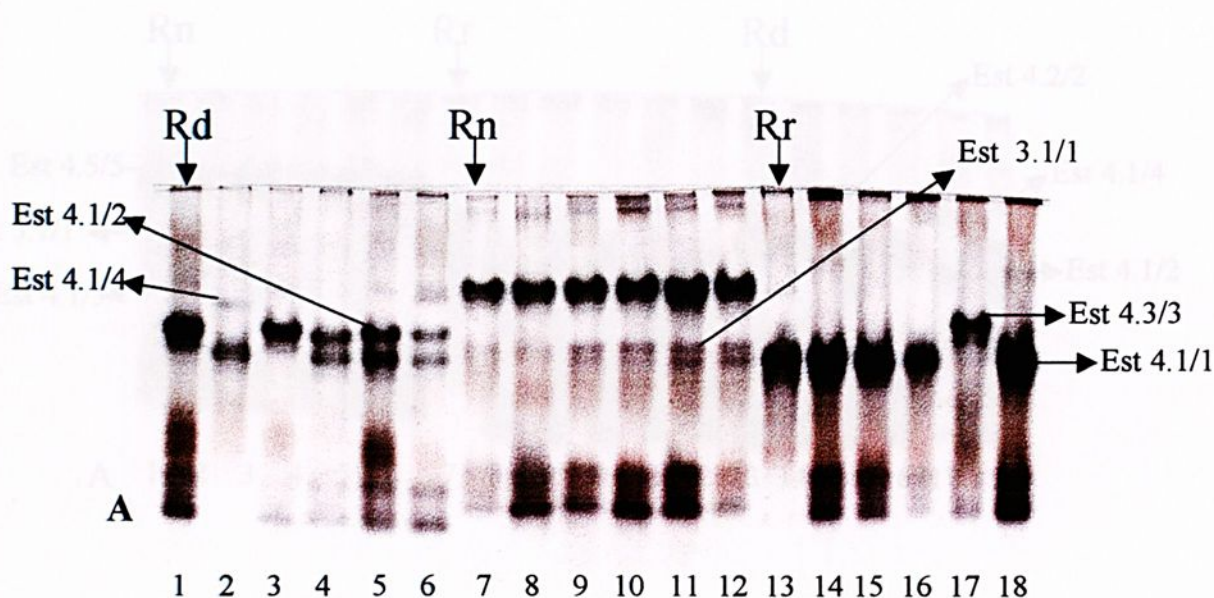


Figura 02. (A) e (B) Padrões esterásicos comparativos em espécies do gênero *Rhodnius*. As setas indicam diferentes genótipos. Os números abaixo correspondem à amostras individuais das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*); Rn (*R. neivai*); Rr (*R. robustus*). As bandas coradas em preto denotam atividade de α -esterase e as bandas coradas em vermelho, de β -esterase.

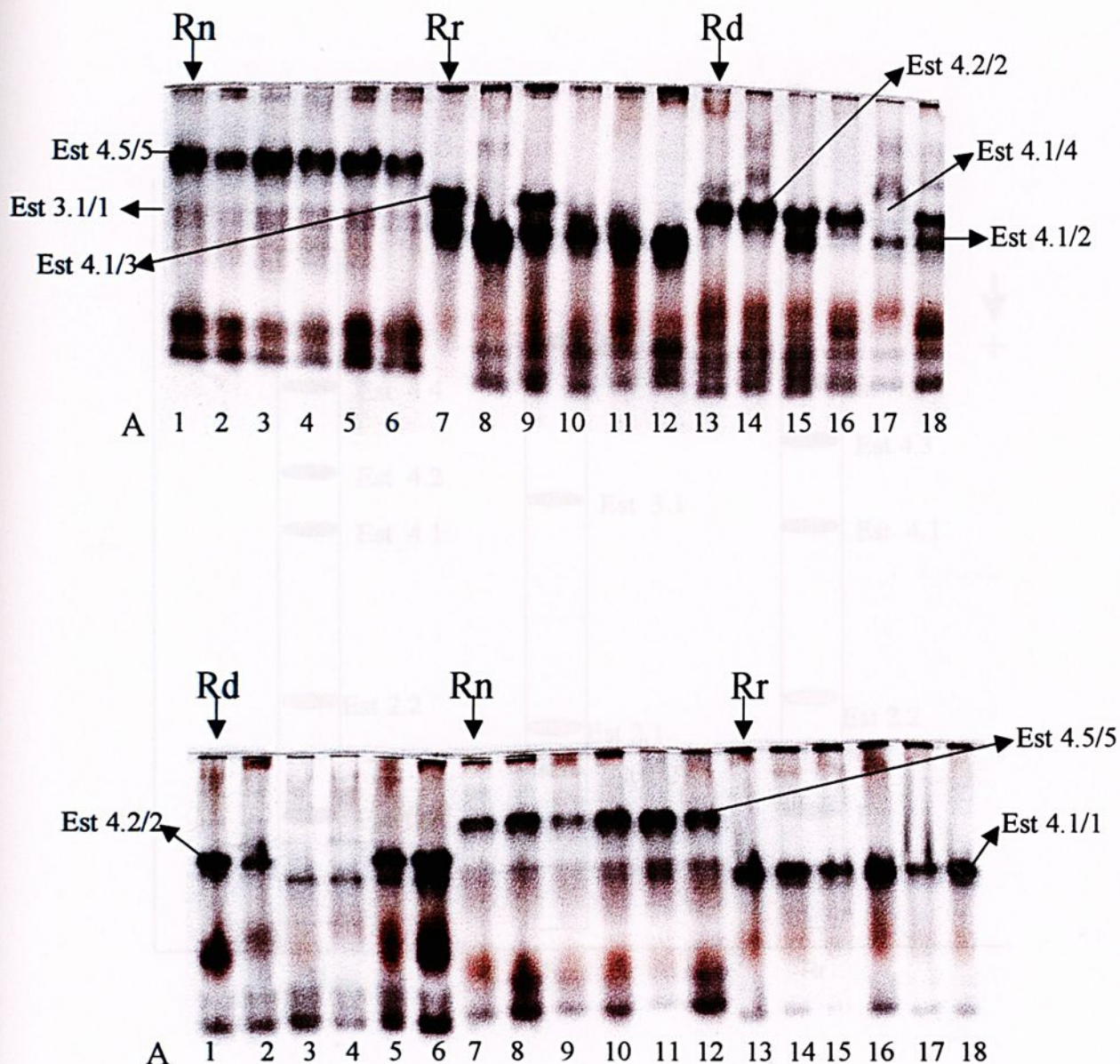


Figura 03. (A) e (B) Padrões esterásicos comparativos em espécies do gênero *Rhodnius*. As setas indicam diferentes genótipos. Os números abaixo correspondem à amostras individuais das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*); Rn (*R. neivai*); Rr (*R. robustus*). As bandas coradas em preto denotam atividade de α -esterase e as bandas coradas em vermelho, de β -esterase.

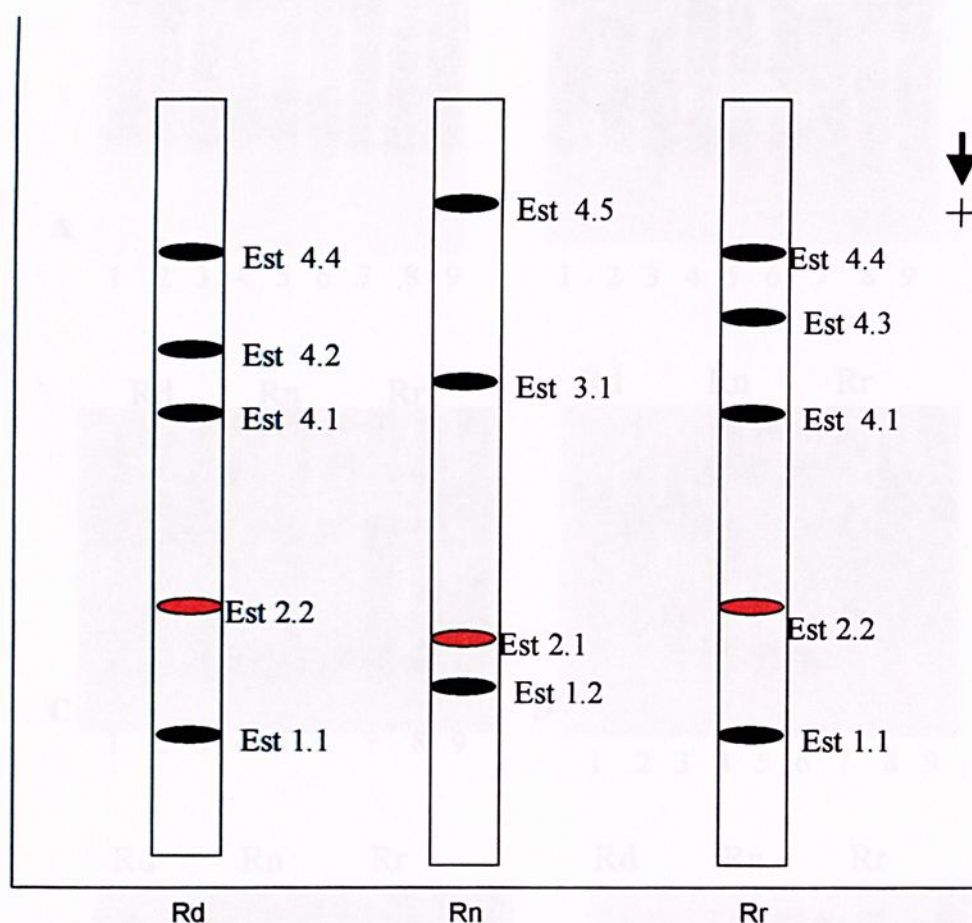


Figura 04. Zimograma representativo dos alelos para os locos esterásicos encontrados em *R. domesticus* (Rd); *R. neivai* (Rn); *R. robustus* (Rr). Demais dados da legenda como indicado nas figuras precedentes.

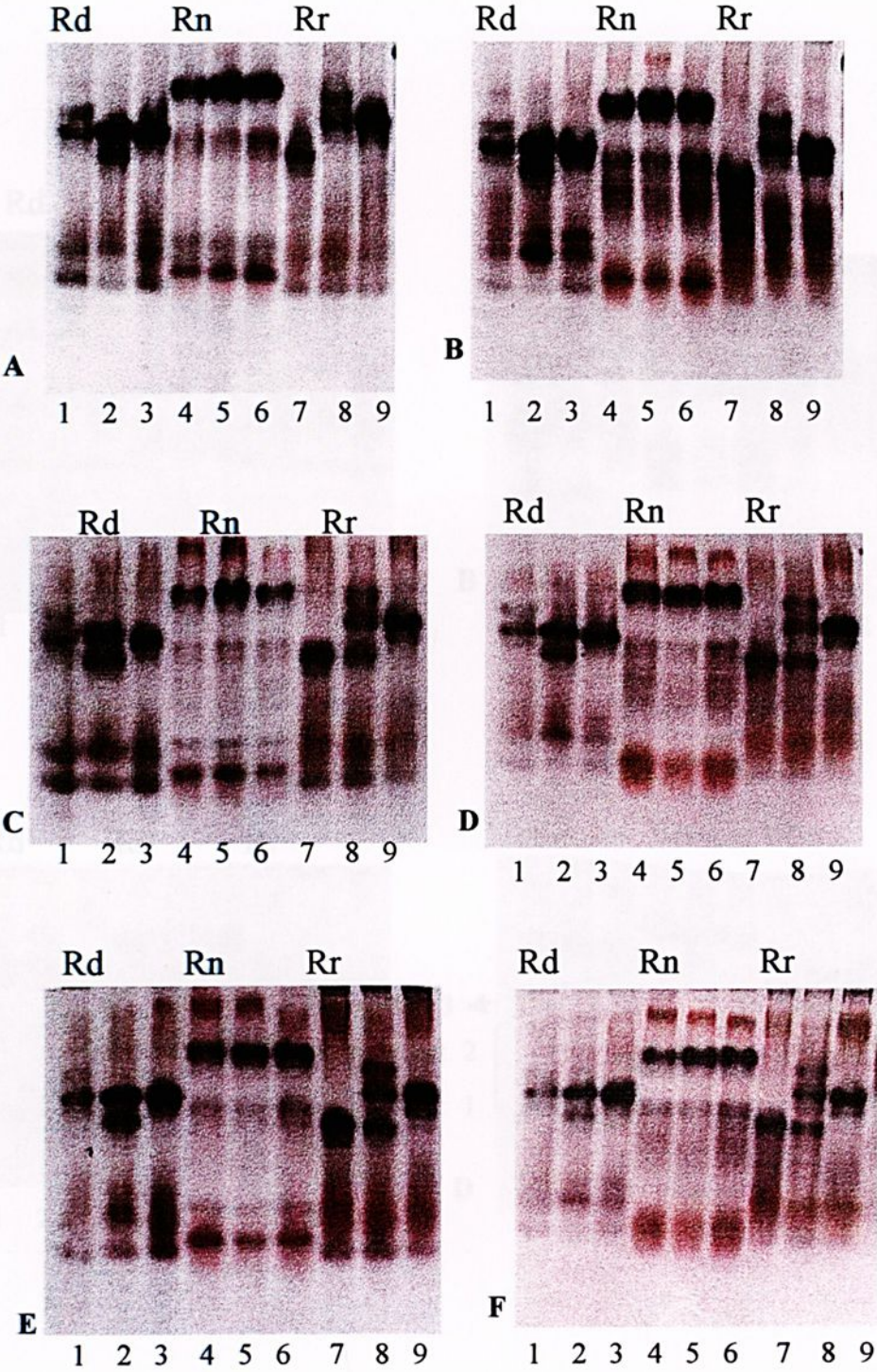


Figura 05. Padrão de inibição das esterases em triatomíneos. A) Controle. B) Inibição por pCMB 1mM. C) Controle. D) Inibição por pCMB a 2mM. E) Controle. F) Inibição por pCMB a 4mM. Rd (*R. domesticus*, 1-3); Rn (*R. neivai*, 4-6); Rr (*R. robustus* 7-9).

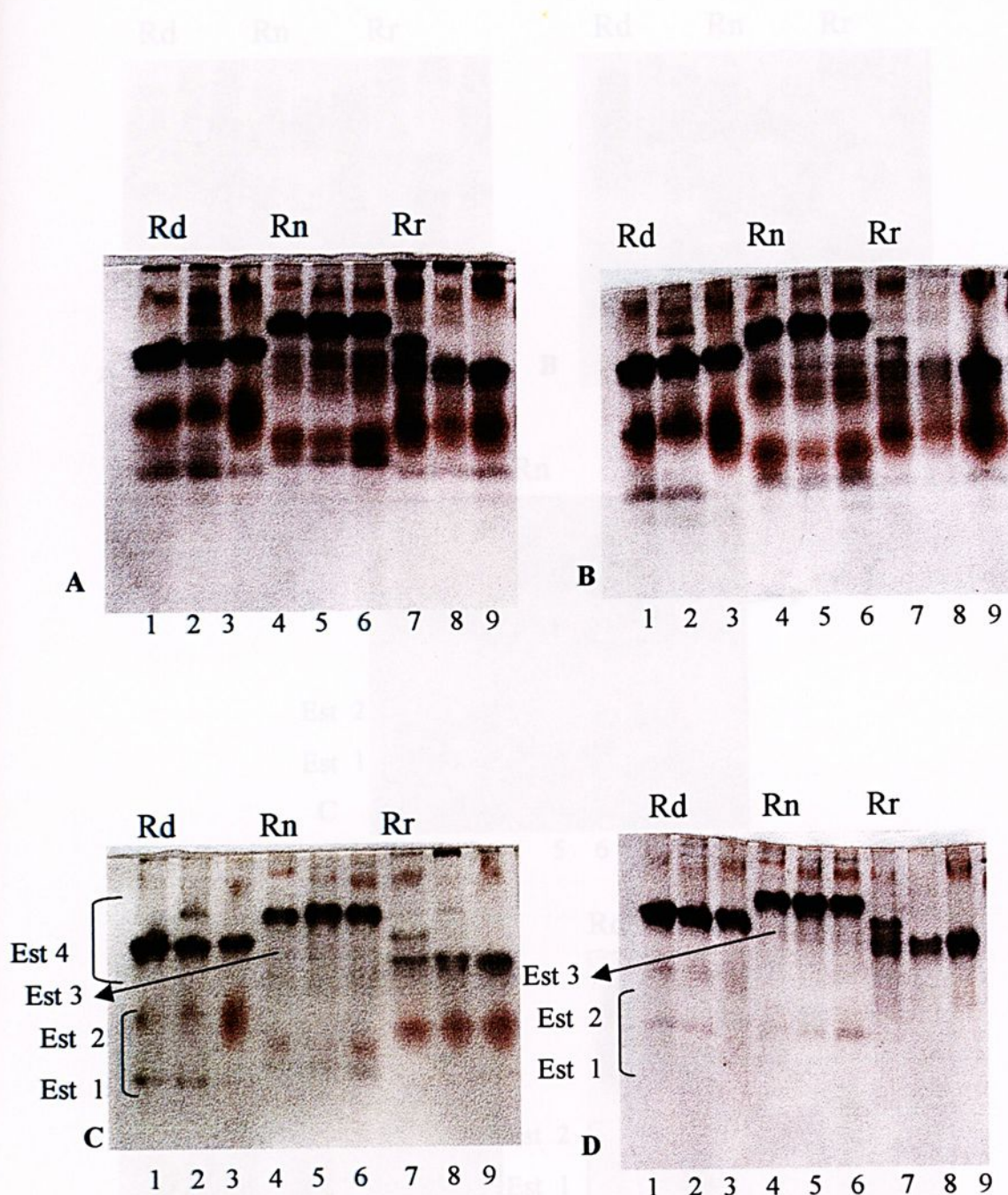


Figura 06. Padrão de inibição das esterases em triatomíneos. A) controle, B) Inibição por iodoacetamida a 2mM. C) Inibição por Malathion a 2mM. D) Inibição por sulfato de eserina a 1,5 mM. Regiões inibidas indicadas nas figuras. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), Rr (*R. robustus*).

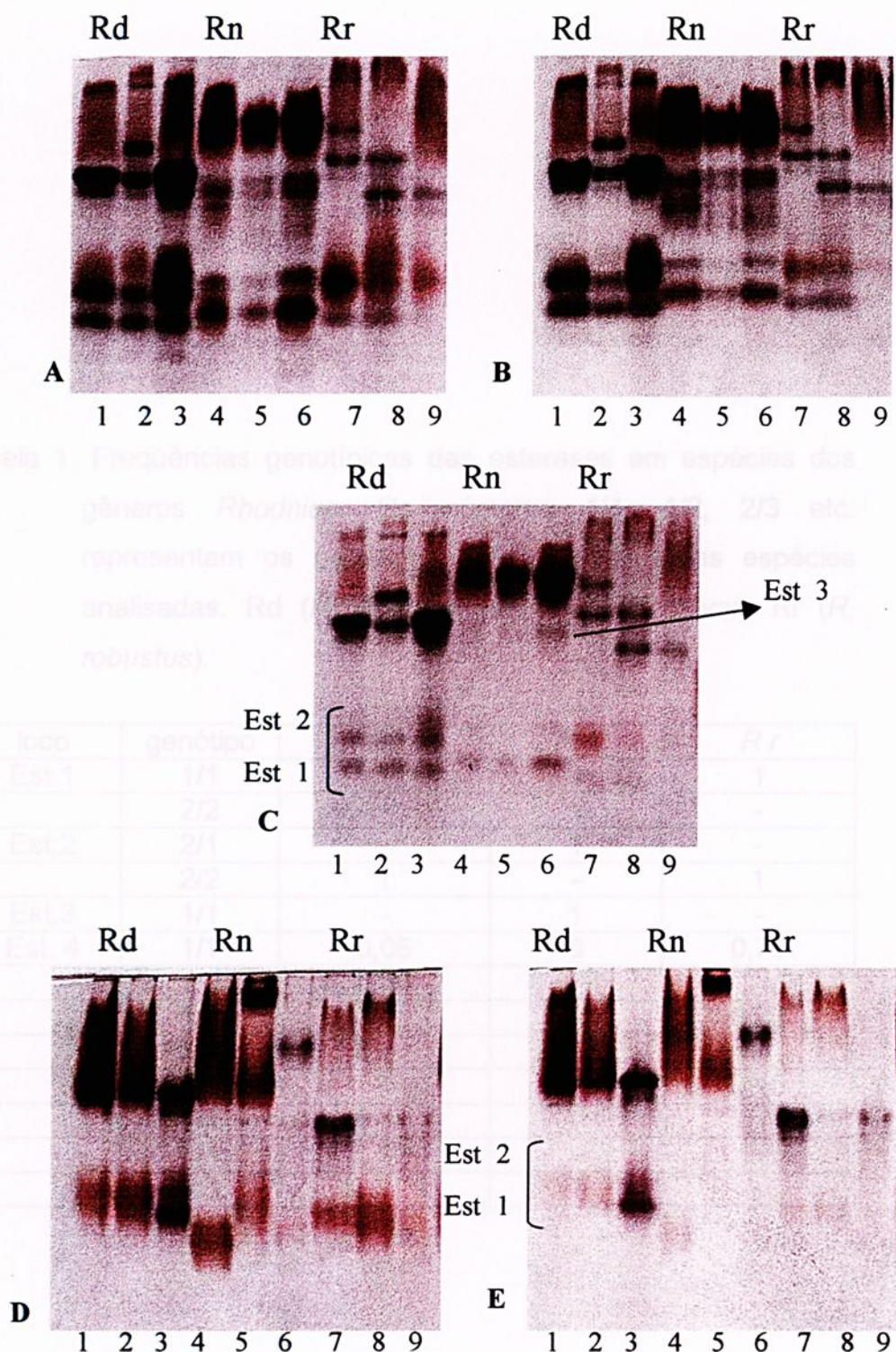


Figura 07. Padrão de inibição das esterases em triatomíneos. A) Controle. B) Inibição por HgCl₂ 1mM. C) Inibição por sulfato de eserina a 1mM. D) controle. E) Inibição por HgCl₂ a 2mM. Regiões inibidas indicadas nas figuras. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), Rr (*R. robustus*).

Tabela 1. Frequências genotípicas das esterases em espécies dos gêneros *Rhodnius*. Os números 1/1, 1/2, 2/3 etc. representam os genótipos. N = 36 em todas espécies analisadas. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), Rr (*R. robustus*).

loco	genótipo	Rd	Rn	Rr
Est.1	1/1	1	-	1
	2/2	-	1	-
Est.2	2/1	-	1	-
	2/2	1	-	1
Est.3	1/1	-	1	-
Est. 4	1/1	0,06	0	0,70
	1/2	0,36	-	-
	1/3	-	-	0,20
	2/2	0,41	-	-
	3/3		-	0,10
	1/4	0,14	-	-
	4/4	0,03	-	-
	5/5	-	1	-

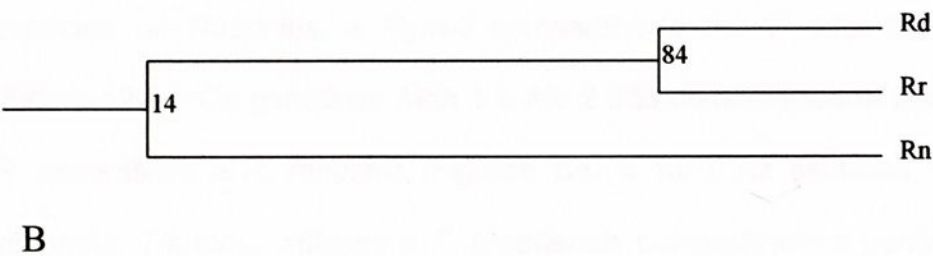
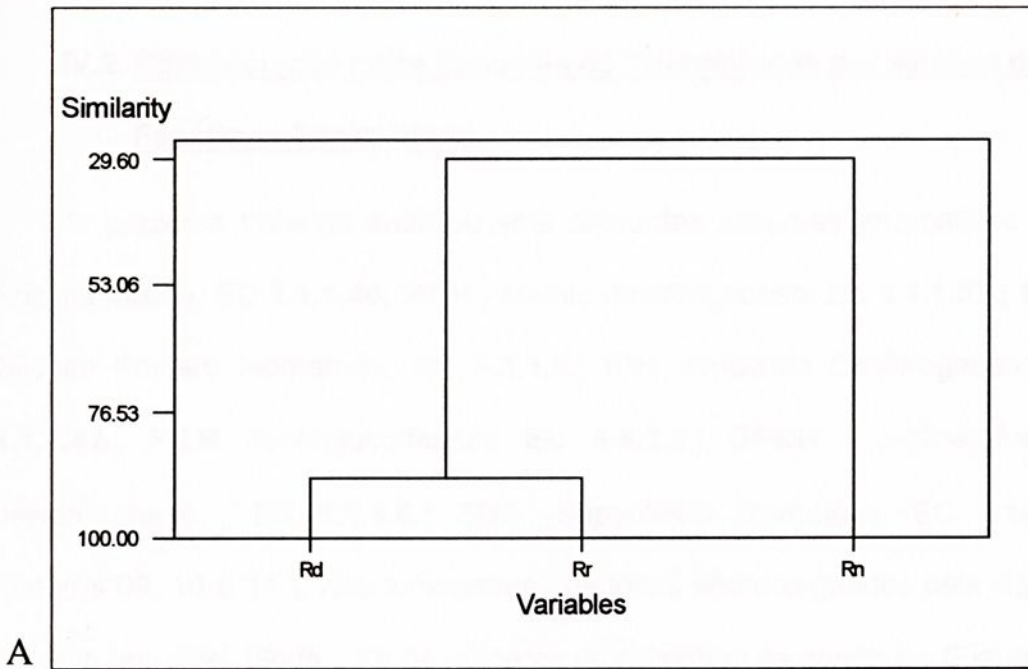


Figura 08. A) Análise de similaridade entre *R. domesticus* (Rd), *R. neivai* (Rn), *R. robustus* (Rr). B) Dendograma construído pelo método de UPGMA mostrando as relações filogenéticas entre as espécies de *Rhodnius*. Os números internos representam os valores de *Bootstrap* baseados em 1000 réplicas. Análises baseadas nas frequências genotípicas das esterases.

IV.2. Diferenciação entre Espécies de Triatomíneos por Análise de Fenótipos Enzimáticos

O presente trabalho analisou sete diferentes sistemas enzimáticos (**ME** - Enzima Málica, **EC 1.1.1.40**; **MDH** - Malato desidrogenase, **EC 1.1.1.37**.; **GPI** - Glicose Fosfato Isomerase, **EC 5.3.1.9**.; **IDH** - Isocitrato Desidrogenase **EC 1.1.1.42**.; **PGM** - fosfoglucomutase **EC 5.4.2.2**.; **GPDH** - α -glicerofosfato-desidrogenase , **EC 1.1.1.8**.; **SOD** -Superóxido Dismutase, **EC 1.15.1.1**) (Figuras 09, 10 e 11). Nos zimogramas os locos são designados pela sigla do sistema (ex: *Sod*, *Gpdh* ...) e os números representam os genótipos (Figuras 12 e 13). Todos sistemas analisados com exceção de GPDH apresentaram ausência de polimorfismo, tendo um ou outro alelo fixado em diferentes espécies ou ainda compartilhados. O sistema PGM apresenta três alelos distintos. *Pgm-1* exclusivo em *T. brasiliensis*, *Pgm-2* compartilhado pelas três espécies de *Rhodnius*, e *Pgm-3* compartilhado por *T. infestans* e *vitticeps* (Figura 12 A). Os genótipos *Mdh* 1 e *Me* 2 são compartilhados pelas espécies *R. domesticus* e *R. robustus* (Figuras 12B e 13A). As espécies *R. neivai* , *T. infestans*, *Triatoma vitticeps* e *T. brasiliensis* compartilham o genótipo *Me* 1/1. (Figuras 13 A). No loco da enzima Glicose Fosfato Isomerase as três espécies de *Rhodnius* compartilham o alelo *Gpi-4* e as espécies de *Triatoma* apresentam alelos distintos, assim *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *T. vitticeps* apresentam os alelos *Gpi-1*, *Gpi-2* e *Gpi-3* respectivamente, sendo este sistema diagnóstico para as espécies de *Triatoma* analisadas (Figura 12 C). No sistema enzimático α -Gliceroposfato desidrogenase o alelo *Gpdh-4* é compartilhado pelas três

espécies de *Triatoma*, *Gpdh-2* é compartilhado pelas espécies *R. domesticus* e *R. robustus*, *Gpdh-3* é somente observado na espécie *R. neivai* (Figura 12 D). No sistema enzimático isocitrato desidrogenase *R. domesticus* e *R. robustus* apresentam o alelo *Idh-1* em comum, o alelo *Idh-2* é observado em *R. neivai*. As espécies *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *T. vitticeps* apresentam os genótipos *Idh-5/5*, *Idh-4/4* e *Idh 3/3* respectivamente (Figura 13 B). A enzima superóxido dismutase apresenta o alelo *Sod-1* nas espécies de *Rhodnius*, já as espécies de *Triatoma* compartilham o alelo *Sod-2* (Figura 13 C). Os melhores sistemas para diferenciação entre espécies foram GPI, IDH e MDH .

As frequências genotípicas observadas nos diferentes sistemas encontram-se na tabela 2. As análises de UPGMA e *Bootstrap*, baseadas nessas frequências, separaram as tribos Rhodiniini e Triatomini em dois grupos. Além disso as espécies de *Triatoma* apresentaram posições equivalentes na árvore filogenética enquanto em *Rhodnius*, as espécies *R. robustus* e *R. domesticus* apresentaram maior proximidade entre si comparadas à *R. neivai* (Figuras 14 A e B).



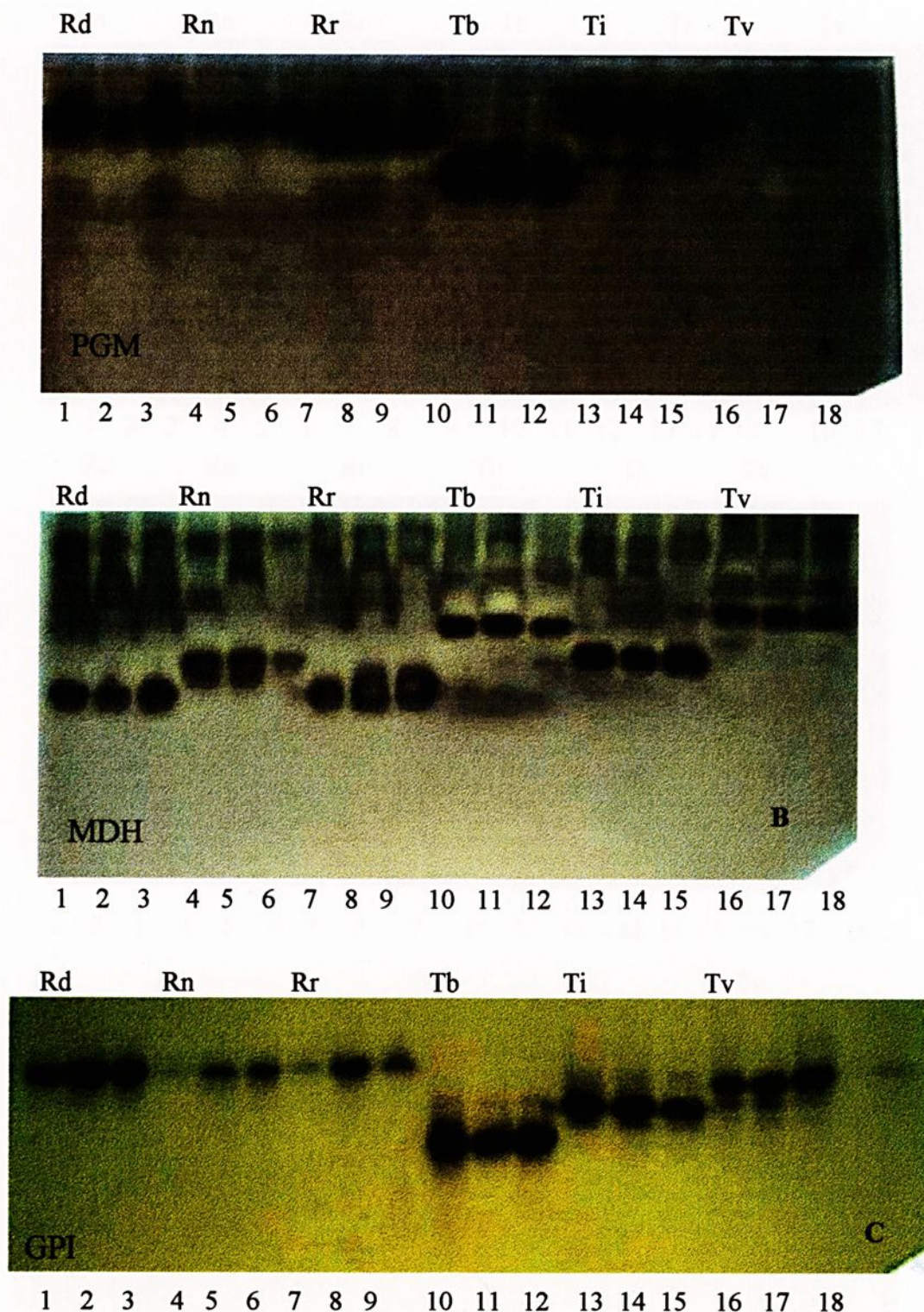
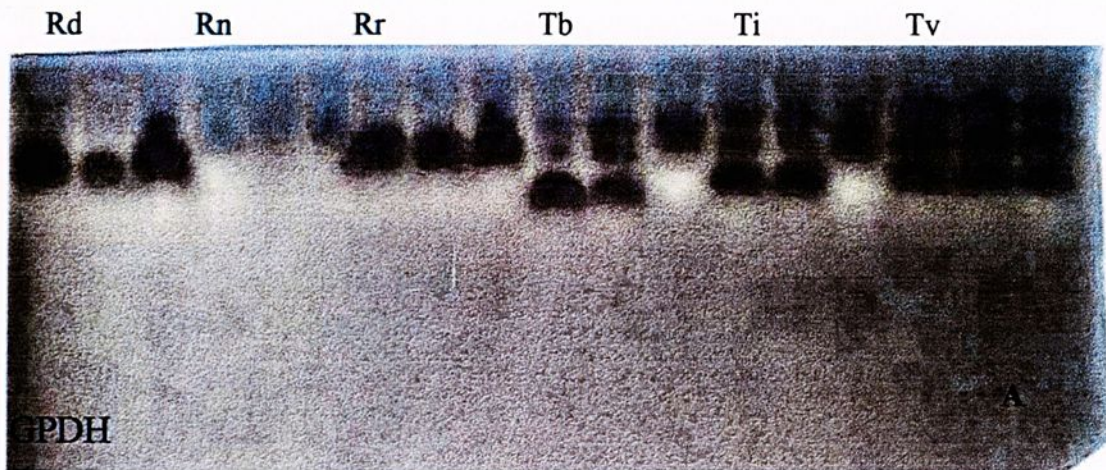


Figura 09. Sistemas enzimáticos em triatomíneos. **(A)** Fosfoglucomutase (PGM). **(B)** Malato desidrogenase (MDH). **(C)** Glicose fosfato isomerase (GPI). Os números abaixo correspondem às amostras das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus* 1-3); Rn (*R. neivai*, 4-6); Rr (*R. robustus*, 7-9); Tb (*T. brasiliensis*, 10-11); Ti (*T. infestans*, 13-15); Tv (*T. vitticeps*, 16-18).

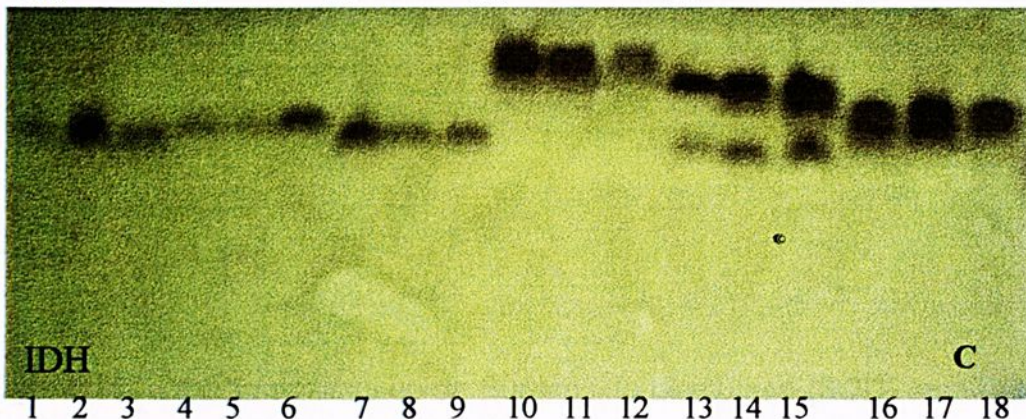




1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Rd Rn Rr Tb Ti Tv



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Rd Rn Rr Tb Ti Tv



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

10. Sistemas enzimáticos em triatomíneos. (A) α -Gliceroposfato desidrogenase (GPDH). (B) Enzima málica (ME) e Malato desidrogenase (MDH). (C) Isocitrato desidrogenase (IDH). Os números abaixo correspondem às amostras das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps*.

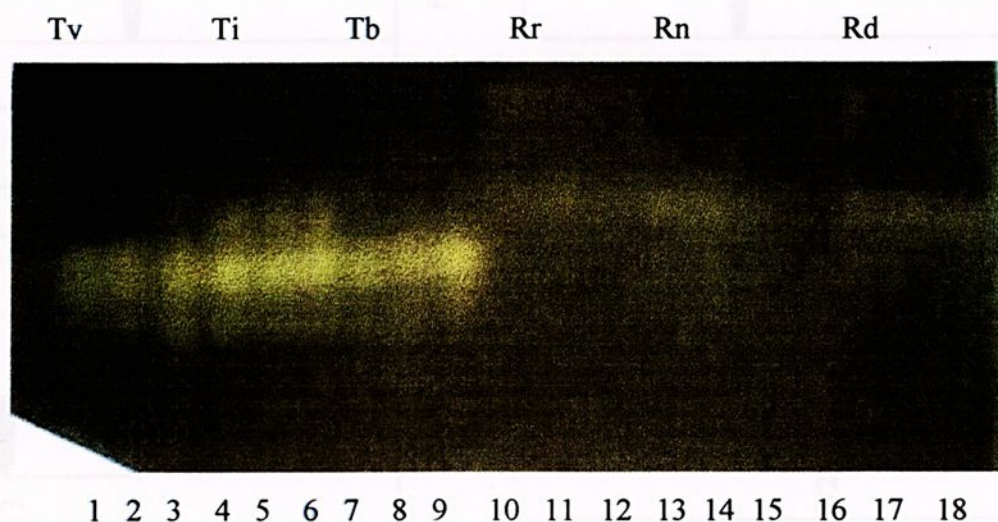


Figura 11. Sistema enzimático da Superóxido dismutase (**SOD**) em triatomíneos.

Os números abaixo correspondem às amostras das espécies indicadas na parte superior do gel. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps*.

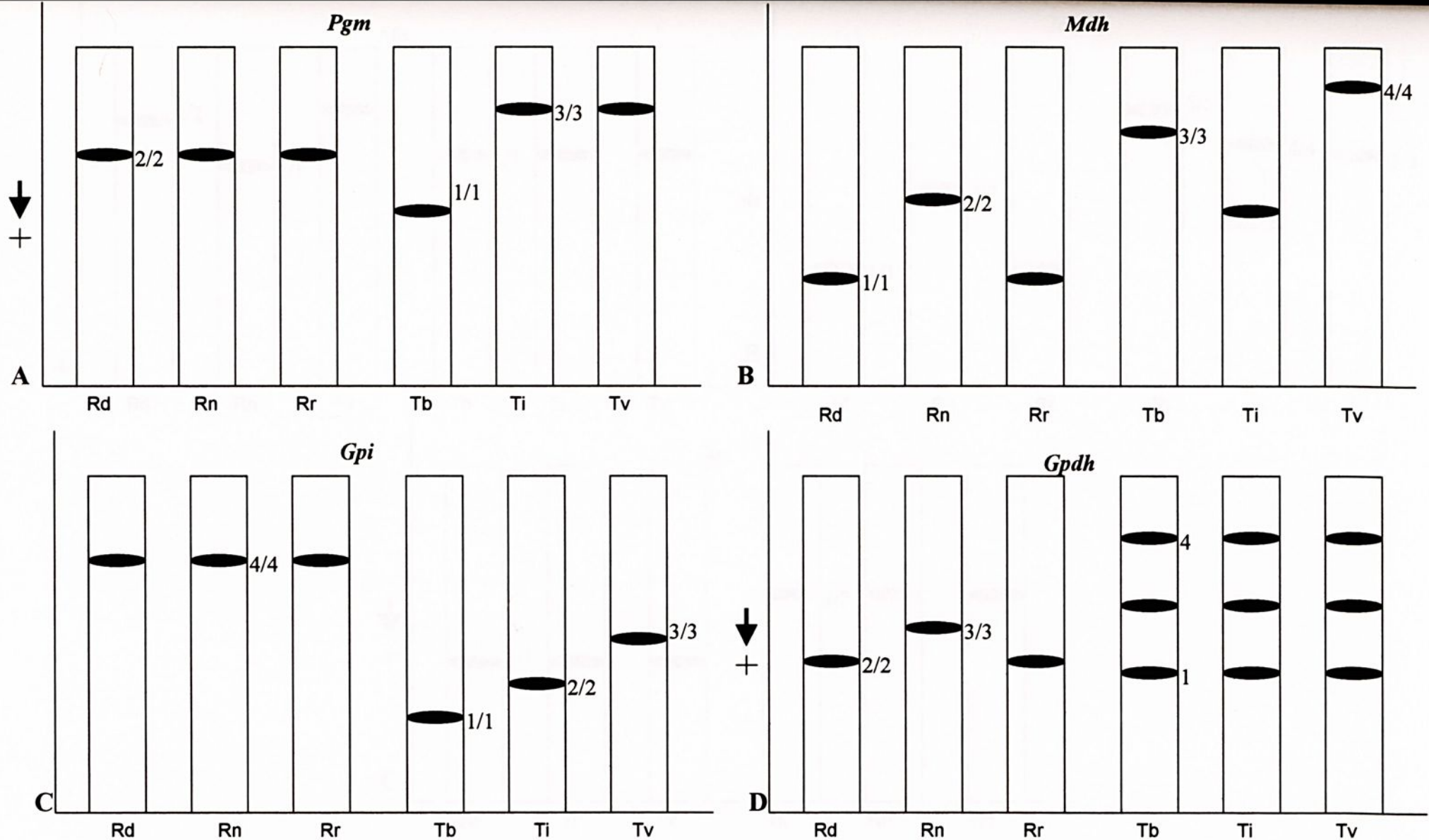


Figura 12. Zimogramas representativos dos sistemas enzimáticos: Fosfoglucomutase (PGM), Malato desidrogenase (MDH), Glucose fosfato isomerase (GPI), α -Glicero fosfato de sódio (GPDH) em *R. domesticus* (Rd); *R. neivai* (Rn); *R. robustus* (Rr), *T. brasiliensis* (Tb), *T. infestans* (Ti) e *T. vitticeps* (Tv). Os números representam os genótipos.

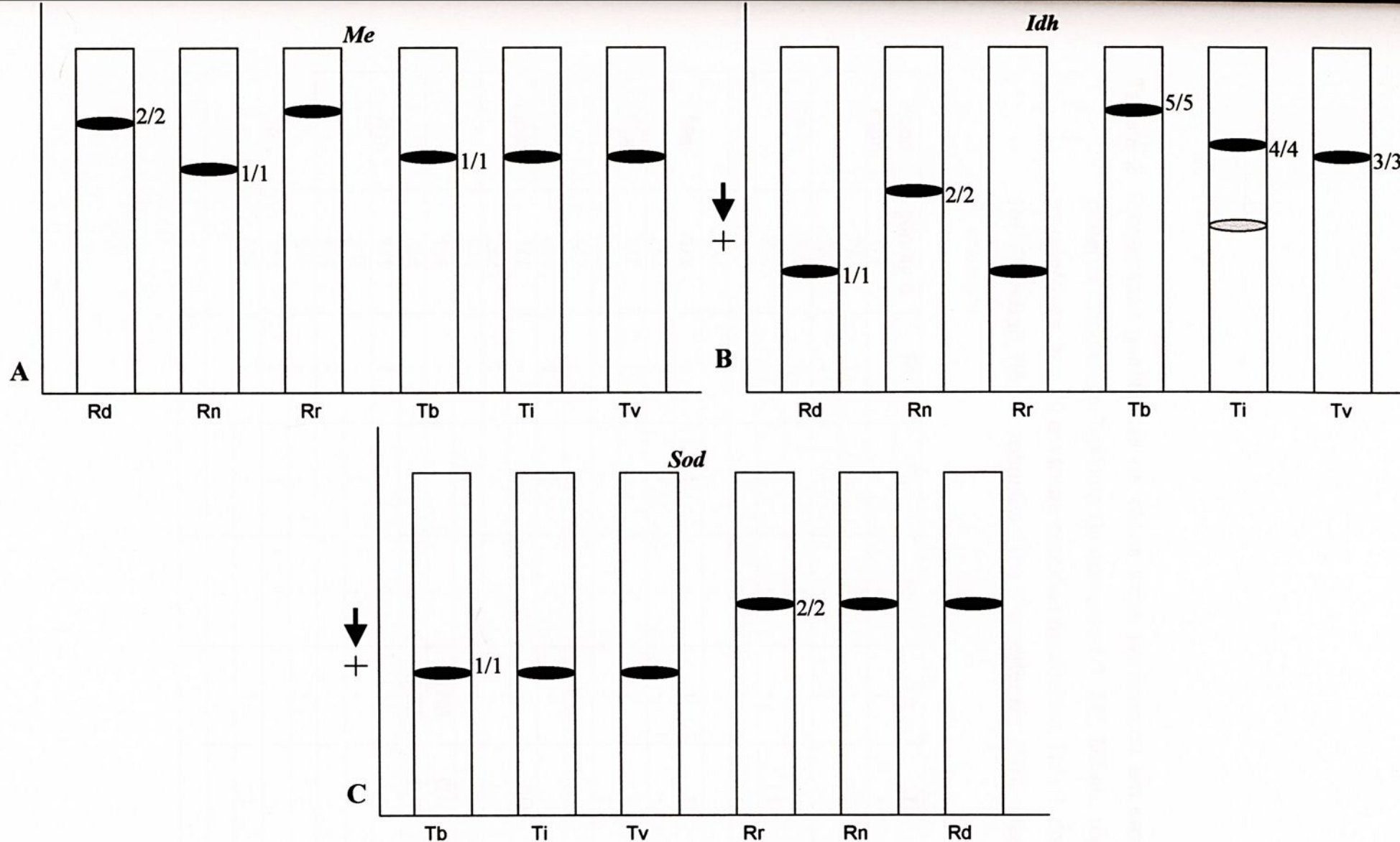


Figura 13. Zimogramas representativos do sistemas enzimaticos: Enzima málica (ME), Isocitrato desidrogenase (IDH), Superóxido dismutase (SOD) em *R. domesticus* (Rd); *R. neivai* (Rn); *R. robustus* (Rr), *T. brasiliensis* (Tb), *T. infestans* (Ti) e *T. vitticeps* (Tv). Os números representam os genótipos.

Tabela 2. Frequências genótípicas de vários locos enzimáticos em espécies dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Os números 1/1, 2/2, 3/3 etc. representam os genótipos. N = 30 em todas espécies analisadas. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps*.

loco	genótipo	Rd	Rn	Rr	Tb	Ti	Tv
Pgm	1/1	-	-	-	1	-	-
	2/2	1	1	1	-	-	-
	3/3	-	-	-	1	-	1
Mdh	1/1	1	-	1	-	-	-
	2/2	-	1	-	-	1	-
	3/3	-	-	-	1	-	-
Me	4/4	-	-	-	-	-	1
	1/1	-	1	-	1	1	1
	2/2	1	-	1	-	-	-
Gpi	1/1	-	-	-	1	-	-
	2/2	-	-	-	-	1	-
	3/3	-	-	-	-	-	1
Gpdh	4/4	1	1	1	-	-	-
	1/1	-	-	-	-	0,06	-
	2/2	1	-	1	-	-	-
Idh	3/3	-	1	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	0,68	0,47	-
	4/4	-	-	-	0,32	0,47	1
Sod	1/1	1	-	1	-	-	-
	2/2	-	1	-	-	-	-
	4/4	-	-	-	-	-	1
	5/5	-	-	-	1	-	-
	1/1	1	1	1	-	-	-
	2/2	-	-	-	1	1	1

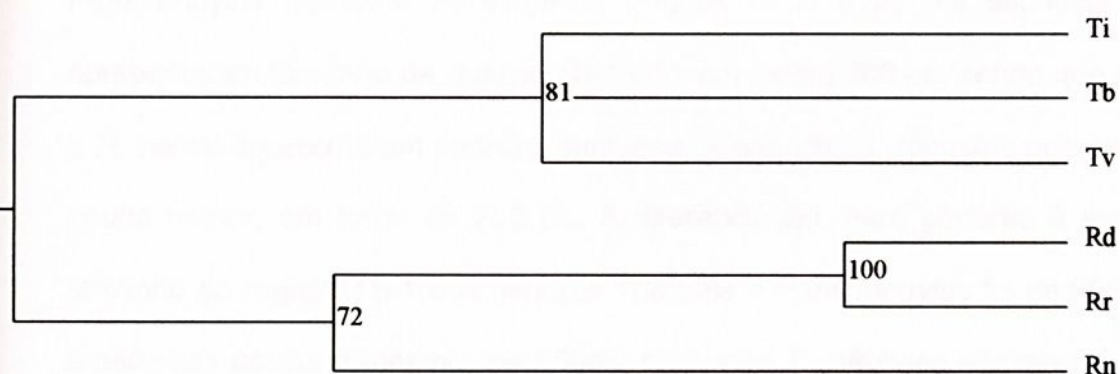


Figura 14. Dendrograma construído pelo método de UPGMA mostrando as relações filogenéticas entre as espécies de *Rhodnius* e *Triatoma*. Os números internos representam os valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas. Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*), (Rr) *R. robustus*, (Tb) *T. brasiliensis*, (Ti) *T. infestans*, (Tv) *T. vitticeps*.

IV.3. Estudo da Variabilidade da Região ITS-1 em Triatomíneos dos Gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* por PCR e RFLP

A análise da região intergênica ITS-1 do DNA ribossômico permitiu a observação da variabilidade genética existente entre as oito espécies de triatomíneos: *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *Panstrongylus herrei* e *P. megistus* (Figura 15 A e B). As espécies de *Rhodnius* apresentaram tamanho da região ITS-1 com em média 300 pb, sendo que *R. domesticus* e *R. neivai* apresentaram padrões similares. A espécie *R. robustus* apresentou tamanho pouco menor, em torno de 250 pb. A diferenciação entre gêneros é evidente, pois o tamanho da região ITS-1 dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* foi de 600 a 1000pb. *T. brasiliensis* possui fragmento de 850pb, enquanto *T. infestans* apresentou fragmento de DNA de 750 pb e *T. vitticeps* de 1000pb. No gênero *Panstrongylus*, *P. herrei* apresentou 600 pb e *P. megistus* 800 pb.

Para detecção de variabilidade entre *R. domesticus* e *R. neivai* aplicou-se a técnica de Análise de Fragmentos de Restrição (RFLP). Procedeu-se a digestão enzimática pela endonuclease *Hae* III, para a espécie *R. domesticus*, os fragmentos clivados apresentaram aproximadamente 150 pb e *R. neivai* não apresentou clivagem enzimática (Figura 16A e B). A enzima *Alu* I não clivou os fragmentos amplificados em ambas espécies (Figura 16 A). No conjunto, os resultados obtidos com essas duas endonucleases permitiram a diferenciação entre *R. domesticus* e *R. neivai*.



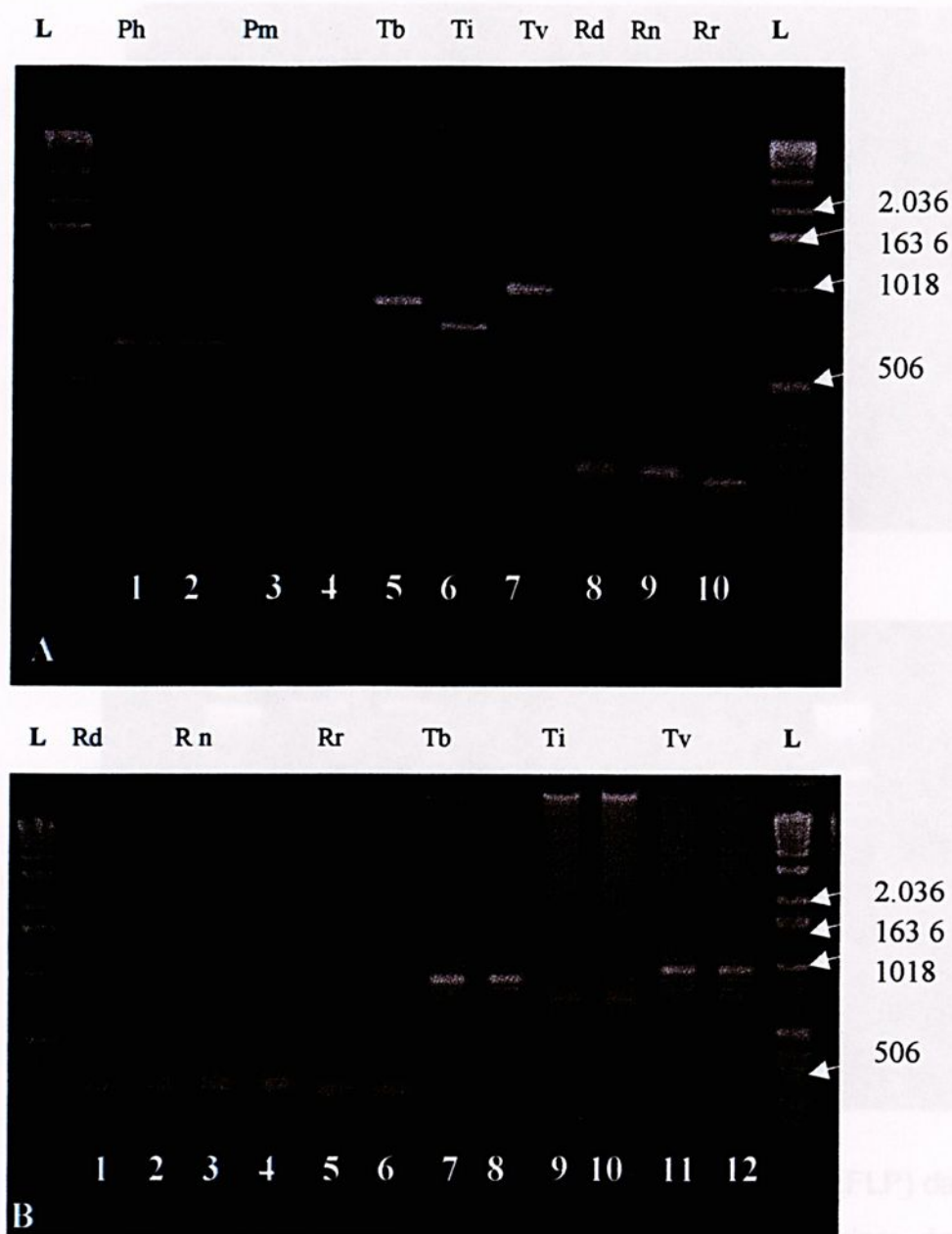


Figura 15. (A) e (B) Polimorfismo de tamanho para a região ITS-1 do DNAr de triatomíneos. Os valores em pares de base dos fragmentos amplificados são: Ph 600 pb, Pm 800 pb, Tb 850 pb, Ti 750 pb e Tv 1000 pb, Rd e Rn 300 pb, Rr 250 pb. A letra L designa os marcadores de tamanho molecular (1Kb Ladder, Gibco). **Figura A:** os números correspondem às espécies indicadas na parte superior do gel. Ph (*P. herreri*, 1-2); Pm (*P. megistus*, 3-4); Tb (*T. brasiliensis*, 5); Ti (*T. infestans*, 6); Tv (*T. vitticeps*, 7); Rd (*R. domesticus*, 8); Rn (*R. neivai*, 9); Rr (*R. robustus*, 10).



Figura 16. (A) Análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) da região ITS-1 em *Rhodnius*. Os números correspondem às espécies indicadas na parte superior do gel. 1 a 4 Fragmentos amplificados não tratados; 5 a 8 fragmentos amplificados tratados com a endonuclease *Hae* III; 9 a 12 fragmentos amplificados tratados com a endonuclease *Alu* I. **(B)** Digestão do fragmento amplificado correspondente à região ITS-1 pela enzima de restrição *Hae* III em *R. domesticus*; 1-6 DNA tratado com a endonuclease *Hae* III. Letra L designa os marcadores de tamanho molecular (1Kb Ladder, Gibco). Rd (*R. domesticus*), Rn (*R. neivai*).

V. DISCUSSÃO

Marcadores bioquímicos e moleculares são importantes ferramentas em estudos de Genética. Vários sistemas enzimáticos podem ser analisados fornecendo informações sobre os polimorfismos observados entre indivíduos, populações e espécies. Entre os sistemas tradicionalmente estudados encontramos as esterases que são enzimas relacionadas a diversas funções biológicas nos organismos e, em decorrência disso, podem apresentar formas polimórficas.

As esterases são bastante estudadas em insetos diferenciando espécies e populações. Também possibilitam estudos de resistência à inseticidas (Saul *et al.*, 1976; Kasule & Cook, 1988; Game & Oakeshott, 1990; Poirié *et al.*, 1992, Parkash & Yadav, 1993; Karotam & Oakeshott, 1993; Oakeshott *et al.*, 1994; Rúvolo-Takasusuki *et al.*, 1997; Ruvolo-Takasusuki *et al.*, 1998; Loxdale *et al.*, 1998b). A similaridade entre seqüências da maioria das carboxil e colinesterases em *Drosophila* e outros organismos faz com que estas sejam reconhecidas como uma família multigênica (Oakeshott *et al.*, 1993).

Sistemas polimórficos como as esterases podem representar numerosas enzimas controladas por locos diferentes (Alfenas, 1991). Para analisar a existência de locos distintos nas espécies estudadas presentemente, foram empregados seis tipos de inibidores (sulfato de eserina, malathion, fluoreto de sódio, cloreto de mercúrio, pCMB e iodoacetamida). Além disso, foram considerados os padrões de migração, a afinidade aos substratos, intensidade de coloração e aspecto da banda.



Este trabalho analisou as esterases de diferentes espécies de *Rhodnius* (*R. domesticus*, *R. neivai* e *R. robustus*) e detectou a presença de três locos gênicos codificantes para colinesterases e carboxilesterases. A análise do padrão esterásico possibilitou a observação da variabilidade genética entre essas espécies.

Nos locos Est 1, Est 2 e Est 3, classificados como colinesterases, os alelos distintos são fixados nas diferentes espécies, sendo que *R. domesticus* e *R. robustus* compartilham os alelos Est 1.1 e Est 2.2, indicando maior similaridade entre estas duas espécies em relação a *R. neivai* que possui os alelos Est 1.2 e Est 2.1. Esses dados, na análise de similaridade entre espécies, levam a uma maior proximidade dessas duas espécies em relação a *R. neivai*, em concordância com a hipótese de que *R. domesticus* é uma espécie derivada de *R. robustus* e que *R. robustus* e *R. neivai* possuem um ancestral em comum. Este ancestral seria a espécie *R. pictipes* segundo Schofield & Dujardin (1999).

Esses dados são reforçados pela observação de que o loco Est 3 é restrito a *R. neivai*, funcionando como loco diagnóstico para esta espécie. Locos diagnósticos para esterases também já foram analisados nas espécies de Coleoptera, *Sitophilus oryzae*, *S. zeamais*, *S. granarius*. Entre os locos esterásicos analisados, Est 2 e Est 3 foram diagnósticos intra e interespecíficos para essas espécies (Pintureau *et al.*, 1991). Análises posteriores permitiram a distinção entre as três espécies e indicaram que *S. oryzae* e *S. zeamais* são mais estreitamente relacionadas do que *S. granarius* (Grenier *et al.*, 1994).



O monomorfismo é característica dos locos Est 1, Est 2 e Est 3. Estes locos apresentam bandas duplas em todos os indivíduos analisados sendo que, a segunda ou terceira banda foram consideradas como enzimas secundárias. Este tipo de enzima caracteriza-se por uma série de bandas que são produtos de mecanismos de pós-tradução conjuntamente com outros fatores. Tais fatores incluem desaminação de resíduos de glutamina e asparagina, acetilação, oxidação de grupos sulfidril, adições e remoções de carboidratos e grupos fosfatos, clivagem da enzima por proteases e agregação ou polimerização da proteína e isomerismo conformacional (Alfenas, 1998).

A presença de monomorfismo em triatomíneos é bastante freqüente. Análises enzimáticas em *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* e *T. rubrovaria* revelaram heterozigotidade estatisticamente baixa (Pereira *et al.*, 1996). Estudos com *R. neglectus* também mostraram completo monomorfismo enzimático, indicando a existência de baixa variabilidade genética no gênero *Rhodnius* (Soares *et al.*, 1999). Brenière *et al.* (1997) estudando *Triatoma infestans* de Arequipa, Peru, observaram baixa taxa de variabilidade neste inseto quando comparado com outros, ou seja, três locos variáveis em 19 estudados.

O loco codificante para a Carboxilesterase Est 4, neste estudo, apresentou polimorfismo nas espécies *R. domesticus* e *R. robustus*. Estas espécies compartilharam o alelo Est 4.1, entretanto, este alelo foi observado em freqüência maior em *R. robustus* (80%) que *R. domesticus* (30%) . Um exemplo de fixação são os alelos Est 4.5 e o Est 3.1 presentes em *R. neivai* que aparecem em 100% dos indivíduos analisados, sendo marcadores intraespecíficos desta espécie.



A fixação de alelos distintos pode funcionar como fator diagnóstico entre as diferentes espécies e, provavelmente, são oriundos de acúmulo de mutações e deriva genética. A deriva pode ocasionar a fixação ou perda de um alelo inteiramente ao acaso, tendo como consequência a divergência genética (Futuyma, 1986).

Heterópteros, incluindo membros da família Triatominae, têm sido analisados para vários sistemas enzimáticos (Almeida, 1982; Dujardin *et al.*, 1987; Frías and Kattan, 1989; Harry *et al.*, 1992; Harry, 1993; García *et al.*, 1995; Solano *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1997, Dujardin *et al.*, 1998 a e b; Monteiro, 1998; Schofield *et al.*, 1999).

As espécies *R. domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *T. vitticeps* foram analisadas para sete sistemas enzimáticos (**ME** - Enzima Málica, **EC 1.1.1.40**; **MDH** - Malato desidrogenase, **EC 1.1.1.37.**; **GPI** - Glucose Fosfato Isomerase, **EC 5.3.1.9.**; **IDH** - Isocitrato Desidrogenase **EC 1.1.1.42.**; **PGM** - fosfoglucomutase **EC 5.4.2.2.**; **GPDH** - α -glicerofosfato-desidrogenase, **EC 1.1.1.8**; **SOD** - Superóxido Dismutase, **EC 1.15.1.1**). Foram observados sete locos gênicos codificantes para essas enzimas, com tendência à fixação de alelos, o que indica baixa variabilidade genética nestes triatomíneos.

As espécies *R. domesticus* e *R. robustus* compartilham o alelo *Me-2*, *Mdh-1*, *Idh-1*, *Gpdh-2*. Observadas conjuntamente *Rhodnius domesticus*, *neivai* e *robustus* foram espécies altamente monomórficas e, para os sistemas GPI, PGM e SOD, todas se apresentaram homozigotas com mesmo alelo fixado para cada sistema analisado. Estas observações concordam com estudos filogenéticos

indicativos de que *R. neivai*, *R. robustus* além de *R. pallescens*, *R. stali*, *R. brethesi*, *R. dalessandroi* originaram-se de *R. pictipes*, que, provavelmente é a espécie mais antiga de *Rhodnius*. Posteriormente, populações de *R. robustus* provenientes do norte e sul da região amazônica deram origem às espécies *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. nasutus* (complexo *prolixus* com estreita similaridade morfológica). *R. neglectus* originou *R. domesticus*, encontrado em bromélias da floresta costeira brasileira (Schofield & Dujardin, 1999).

Considerando que *R. neivai* e *R. robustus* originaram-se da espécie ancestral *R. pictipes* e que *R. robustus* originou *R. neglectus*, que por sua vez, deu origem à *R. domesticus*, torna-se mais claro o porquê do compartilhamento de maior número de alelos entre as espécies *R. robustus* e *R. domesticus*. A espécie *R. neivai*, apesar de compartilhar alelos com as outras duas espécies de *Rhodnius* nos sistemas SOD, PGM e GPI, indicando ancestralidade em comum, não compartilha alelos com as outras espécies de *Rhodnius* analisadas, quanto aos sistemas IDH, GPDH, ME e MDH.

As espécies *R. neivai* e *T. infestans* compartilharam os alelos *Mdh-2*, indicando certo grau de homologia nestas duas espécies de gêneros diferentes. O alelo Me-1 é compartilhado entre *R. neivai* e as três espécies de *Triatoma* analisadas, este compartilhamento pode ser considerado um caráter plesiomórfico. A filogenia do gênero *Rhodnius* foi estudada nas espécies *R. brethesi*, *R. stali* e *R. pictipes*, *R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *R. prolixus* (silvestre e domiciliar), *R. nasutus* e *R. neglectus*. Alguns alelos foram



compartilhados com *T. infestans* e classificados como plesiomórficos (Dujardin *et al.*, 1999).

O monomorfismo tem sido freqüentemente observado em triatomíneos. Os sistemas ME, MDH, GPI, IDH, PGM, GPDH e SOD, analisados neste trabalho, em diferentes espécies de *Triatoma* e *Rhodnius* mostraram tendência à fixação diferencial de alelos corroborando a baixa variabilidade genética nesses insetos. Trabalhos anteriores com as espécies *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. pallescens*, *R. pictipes* e *R. stali*, analisadas por multilocos enzimáticos não apresentaram heterozigotos nos dezessete locos analisados (Chavez *et al.*, 1999). Populações de *T. infestans* da Bolívia mostraram baixo grau de polimorfismo com tendência à fixação de alelos (Brenière *et al.*, 1998) e populações de *T. sordida* também exibiram baixa variabilidade genética (Noireau *et al.*, 1999).

O compartilhamento de alelos e fixação dos mesmos já foram estudados em outras espécies de triatomíneos. Estudos com as espécies *R. prolixus* e *R. Robustus*, analisadas para os sistemas enzimáticos AO, CA, DIA, ES, ES-A, FH, GPDH, G6PD, GPI, MDH, ME, 6PGD, PGM, envolvendo 16 locos estruturais, mostraram que estas espécies compartilham os mesmos alelos nos mesmos locos. Em contraste, *R. pictipes* foi diferenciado das duas outras espécies em 12 locos diagnósticos com diferentes alelos fixados (Harry *et al.*, 1992).

O padrão eletroforético das enzimas PEP, GPI e ICD permitiu a distinção entre *R. prolixus* e *R. pallescens* e PGD, PGM e MDH entre populações silvestres e domiciliares de *R. prolixus*. Os fenótipos de PGD, MDH e HK foram compartilhados por *R. prolixus* e *R. pallescens* silvestres (Lopez *et al.*, 1995). Os

padrões dos sistemas HK-1 e ICDH-2 foram estudados em quatro espécies de *Triatoma*, *T. sordida*, *platensis*, *guasayana* e *infestans*. O sistema ICDH-2 mostrou diferentes alelos fixados em *T. sordida*, *T. guasayana* e *T. infestans* e *T. platensis*. No loco HK-2, os alelos mais freqüentes em *T. sordida*, *platensis* e *guasayana* e o alelo fixado de *T. infestans* foram distintos. O loco *Hk-1* foi ausente em *T. guasayana*, mas apresentou um único alelo fixado em *T. sordida* e *T. platensis* e dois alelos fixados em *T. infestans* (García *et al.*, 1995).

A principal tendência na evolução de predadores de vida livre para hematófagos habitantes de ninhos é a redução da variabilidade genética. Os fatores responsáveis por esta redução possivelmente são a alta densidade populacional, não exposição a predadores devido à proteção nos ninhos, comportamento de corte e sistema sensorial para procura de alimento simplificados, saliva com substâncias inibidoras da dor e capacidade de dispersão passiva pelo transporte por animais dos quais se alimentam (Schofield, 1988).

Como já salientado, triatomíneos em geral possuem baixa variabilidade genética, característica que parece ser comum em insetos especialistas. Normalmente, espécies domiciliares apresentam menor variabilidade que espécies selvagens. A variedade de nichos ecológicos disponível nos ambientes silvestres provavelmente influencia na manutenção da variabilidade genética (Lopez *et al.*, 1995). Nesse sentido essas espécies podem habitar seus nichos particulares ao invés de estarem restritas ao domicílio e peridomicílio.

As espécies de *Triatoma* ora analisadas, *T. infestans*, *brasiliensis* e *vitticeps*, pertencem ao complexo *infestans* de espécies (Schofield, 1988). A semelhança



enzimática destas espécies, denotada pelos alelos *Gpdh-1* e *4*, *Sod-1* e *Me-1*, comum às três espécies, e *Pgm-3* agrupando *T. infestans* e *T. vitticeps*, não é tão expressiva quanto a encontrada nas espécies de *Rhodnius*. Este fato pode ser devido à origem polifilética da tribo triatomini, pois, acredita-se que esta tribo é originada por um certo número de ancestrais Heteroptera (Schofield, 1988; Bargues *et al.*, 2000). Essas observações foram válidas para os sistemas MDH, GPI e IDH, quando analisamos os zimogramas das espécies de *Triatoma* é comum a observação de alelos diagnósticos entre espécies. Assim, além do monomorfismo estabelecido, a fixação de alelos distintos é uma constante nesses insetos.

A fixação de determinados alelos em espécies distintas de triatomíneos pode ser observada amplamente na literatura. Há referências de estudos com *T. sordida* e *T. guasayana* mostrando sete locos com alelos distintos fixados. Isso indica clara diferença entre estas espécies, sendo que um dos locos analisados é específico de *T. sordida* (Noireau, 1998). Análises enzimáticas dos locos *ldh-2* e *Mdh-2* indicam que espécimes de *T. sordida* provenientes de duas localidades do Chaco Boliviano, são espécies distintas, com recente divergência evolutiva (Noireau, 1998). Os padrões eletroforéticos de *ldh-2* e *Hk-1* foram únicos em quatro espécies de *Triatoma* (*T. sordida*, *T. platensis*, *T. guasayana* e *T. infestans*). O loco *Hk-2* mostrou diferentes alelos fixados em três das espécies analisadas (García *et al.*, 1995).

O estudo conjunto das tribos Rhodniini e Triatomini para diferentes sistemas enzimáticos indica que estas espécies e gêneros evoluíram possivelmente de

ancestrais distintos. Enquanto no gênero *Rhodnius* encontramos um conjunto de locos e alelos altamente compartilhado e forte presença de monomorfismo entre espécies, no gênero *Triatoma*, além do sempre presente monomorfismo, observamos conjuntos de alelos, muitas vezes específicos para uma ou outra espécie. Estes resultados corroboram estudos previamente realizados, fortemente indicativos de que as espécies das tribos Rhodniini e Triatomini evoluíram de ancestrais distintos (Schofield & Dujardin, 1999; Bargues *et al.*, 2000; Marcilla *et al.*, 2001).

O presente trabalho permitiu a observação do padrão de diferenciação enzimático em seis espécies dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma* pelo estudo de sete sistemas enzimáticos corroborando a hipótese evolutiva de distinta ancestralidade entre as tribos Rhodniini, e Triatomini, além de reforçar dados sobre variabilidade genética e filogenia dos triatomíneos.

O estudo de marcadores moleculares do presente trabalho também possibilitou a diferenciação das tribos Rhodniini e Triatomini. O DNA ribossomal é utilizado em estudos filogenéticos de vários níveis taxonômicos, desde filo a populações. Por pertencer a famílias multigênicas, cópias individuais do DNAr não acumulam mutações independentemente, resultando em pequena variação intraespecífica e relevante diferenciação interespecífica (Onyabe & Conn, 1999).

Uma das mais notáveis características do DNAr é a homogeneidade de seqüências desta família de multigenes que tem sua origem por um processo chamado evolução horizontal e, mais recentemente, denominado evolução combinada. É amplamente aceito que neste tipo de evolução uma simples

mutação pode ser fixada em um pequeno espaço de tempo devido ao “crossing over” desigual ou conversão gênica. Este processo de homogeinização é descrito como “deriva molecular”. As regiões codificantes apresentam pequena divergência entre espécies relacionadas, enquanto as regiões espaçadoras exibem alta taxa de variabilidade (Jobst *et al.*, 1998).

As regiões internas transcritas (ITS-1 e ITS-2) do DNA ribossômico são ferramentas importantes para resolver associações de táxons estreitamente relacionados que tenham divergido recentemente, ou seja, a menos de 50 milhões de anos e são excelentes marcadores para distinção entre espécies. As regiões internas transcritas do DNAr estão normalmente presentes em seqüências em *tandem* e são importantes marcadores de polimorfismo molecular (Marcilla *et al.*, 2001).

As análises moleculares presentemente realizadas com triatomíneos permitiram avaliar o polimorfismo de tamanho existente nas regiões intergênicas ITS-1 do DNA ribossômico de oito espécies de triatomíneos: *R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neivai*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *P. megistus* e *P. herreni*. As espécies de *Rhodnius* estudadas apresentaram tamanho de fragmento ITS-1 com média de 300 pb. A diferenciação genética entre gêneros foi significativa, pois o tamanho do amplificado da região ITS-1 em *Triatoma* e *Panstrongylus* é de aproximadamente 600 a 1000 pb.

Muitos organismos têm sido analisados e comparados por meio de regiões espaçadoras do DNA ribossômico. A diferenciação entre bactérias do grupo *enterococci* foi estudada por amplificação da região ITS e os resultados permitiram



agrupar as espécies analisadas em três conjuntos; aquelas espécies que não puderam ser diferenciadas por PCR foram diferenciadas por digestão da região ITS com a endonuclease *Sau 3A* (Tyrrel, 1997). A região ITS-1 também foi utilizada para identificar o fungo *Magnaporthe poae* por PCR e pode diferenciar esta espécie de outras espécies relacionadas (Bunting, 1996). Os ovos e larvas de *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*, presentes nas fezes de hospedeiros e no meio ambiente, foram diferenciados utilizando-se o primeiro espaçador interno transcrito do DNA ribossômico como marcador (Monti *et al.*, 1998).

Alta variabilidade genética também tem sido observada na região IGS do DNA ribossômico. Dezesete populações do mosquito *Aedes albopictus* analisadas possuíam variação intra e inter populacionais quanto ao tamanho e sequência da região intergênica IGS (Black *et al.*, 1989). Variação no comprimento e número de cópias da região IGS foi analisada para diferenciação genética entre populações de *Anopheles albimanus* da Guatemala, América Central e do Sul. A diversidade da região IGS na América Central foi 50% maior do que aquela da América do Sul, sugerindo a existência de barreiras ao fluxo gênico nestas populações (De Merida, 1995).

O espaçadores internos transcritos do DNA nuclear (ITS-1 e ITS- 2) demonstraram ser uma boa ferramenta para a estimativa de eventos mais recentes. ITSs desenvolvem-se mais rapidamente do que o gene 18S do DNA. Estas regiões têm sido utilizadas para estimar relógios moleculares, sendo a taxa de substituição de bases para região ITS-2 (0,3-0,8% por milhão de anos) mais

conservada que a região ITS-1. A região ITS-2 desenvolve-se de 23 a 55 vezes mais rapidamente que o DNAr 18S (Bargues *et al.*, 2000).

A variação genética das regiões intergênicas do DNA ribossômico é aplicada ao estudo de várias espécies de insetos. Esta região é utilizada para diferenciar espécies de *Anopheles*. *A. gambiae* apresenta um amplificado de 390pb e *A. arabiensis* com 310 pb. A espécie *A. bwambae* mostra dois produtos de PCR, com 690pb e 390 pb. O produto de 390 pb de *A. bwambae* e *A. gambiae* foi idêntico (Townson *et al.*, 1994). Espécies e subgêneros das espécies de mosquito *Culex* foram analisadas para as regiões ITS-1 e ITS-2 e permitiram inferências filogenéticas nestes insetos (Miller, 1996).

As espécies de mosquito *Culex tritaeniorhynchus*, *C. pseudovishnui* e *C. vishnui*, cujos adultos são de difícil identificação, são prontamente identificadas pela amplificação da região ITS-1 (Toma *et al.*, 2000). A amplificação da região intergênica do DNAr dos vetores da malária *Anopheles bwambae* e *A. gambiae* produzem fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, permitindo a diferenciação destas espécies (Townson & Onapa, 1994). Espécies crípticas do grupo *A. punctulatus*, insetos vetores da malária e filariose, são diferenciadas pelo tamanho de fragmento e sequenciamento da região ITS-2, o tamanho desse fragmento variou entre 549pb a 565 pb (Beebe *et al.*, 1999). Seis espécies crípticas de *A. maculipennis* foram diferenciadas pelo sequenciamento e tamanho de fragmento da região ITS-2; para cada espécie foi observado um tamanho de fragmento distinto (Proft *et al.*, 1999). Análises da classificação taxonômica de



Hymenoptera, Formicidae, pela região ITS-1 possibilitou melhor distribuição de espécies em suas respectivas tribos (Baur *et al.*, 1996).

No presente estudo a ampla diferença de tamanho nas seqüências da região ITS-1 do gênero *Rhodnius* comparado à *Triatoma* e *Panstrongylus* corroboram estudos sobre a ancestralidade das tribos Rhodniini e Triatomini. Estes resultados também reforçam a origem polifilética dos triatomíneos (Schofield, 1988; Carcavallo *et al.*, 1999; Marcilla *et al.*, 2001; Bargues *et al.*, 2000). Há Hipóteses que propõem que os triatomíneos surgiram várias vezes durante o curso da evolução e que são provenientes de ancestrais distintos, provavelmente, reduvídeos predadores. O polimorfismo de tamanho das seqüências analisadas permitiu a diferenciação das duas tribos, corroborando a distinta ancestralidade das mesmas.

Dados da literatura indicam que, em geral, as seqüências ITS têm a mesma extensão em diferentes espécies do mesmo gênero (Marcilla *et al.*, 2001). Entretanto, isso não foi observado nas diferentes espécies de triatomíneos analisadas neste trabalho, principalmente no gênero *Triatoma*, cuja possível origem é polifilética (Schofield, 1988). Já, as espécies de *Rhodnius* apresentaram mesmo tamanho de fragmento, em *R. domesticus* e *R. neivai*, e diferença em torno de 50 pares de base para a espécie *R. robustus*. Possivelmente, estes resultados refletem a origem monofilética da tribo Rhodniini, que, segundo Schofield & Dujardin (1999), originou-se de *R. pictipes*, a partir da região amazônica e, posteriormente, irradiou-se para outras áreas.

Para distinguir as espécies de *R. domesticus* e *R. neivai*, que apresentaram tamanho de fragmentos amplificados idênticos, as seqüências foram digeridas com endonucleases de restrição. A enzima *Hae III* digeriu a região ITS-1 de *R. domesticus* em dois fragmentos de aproximadamente 150 pb, o que permitiu a diferenciação destas espécies. Entretanto, a endonuclease *Alu I* não detectou diferenciação genética.

O tempo de divergência do ancestral Triatomini em relação ao ancestral de Rhodniini foi estimado em 48,9-64,4 milhões de anos. A emergência dos reduvídeos predadores antes ou durante o início do período cretáceo (135-70 milhões de anos) é consistente com a grande diversidade nos continentes então ainda não separados. A análise das regiões ITS-2 e 18S do DNAr indicou que a divergência entre as tribos *Triatomini* e *Rhodniini*, possivelmente ocorreu no baixo Terciário. Esses estudos também indicaram que a tribo Triatomini teve origem polifilética (Bargues *et al.*, 2000).

O tempo estimado de separação do Gondwana é de 100-90 milhões de anos. A África e América do Sul começaram a dividir-se na porção sul há 120 milhões de anos, mas não se tornaram separadas antes de 100 milhões de anos atrás. A divergência dos ancestrais das tribos Triatomini e Rhodniini ocorreu quando a América do Sul já era separada da África. As diferenças de nucleotídeos entre as seqüências ITS-2 das Tribos Triatomini e Rhodniini são numerosas, em torno de 85% de posições variáveis no alinhamento entre espécies de *Rhodnius* e *Triatoma* analisadas (Bargues *et al.*, 2000).



As análises da região ITS-2 dessas tribos também apresentaram significantes diferenças no tamanho das seqüências.. Devido a alta variação no alinhamento de seqüências, as tribos foram consideradas separadamente, suportando a teoria de que os triatomíneos têm origem polifilética (Marcilla *et al.*, 2001).

A distinção entre as tribos Rhodniini e Triatomini foi claramente observada no presente trabalho. Interessantemente, as espécies de *Panstrongylus* analisadas, *P. herrei* e *P. megistus*, apresentaram tamanhos de seqüências próximos às espécies de *Triatoma*, coincidindo com dados filogenéticos que classificam o gênero *Panstrongylus* como membro da tribo Triatomini.

Análises de DNA mitocondrial mostra que as seqüências entre espécies de *Rhodnius* e entre espécies de *Triatoma* apresentam média de identidade maior que a comparação dos grupos *Rhodnius* e *Triatoma*; também concordando com a divisão destas espécies nas tribos Rhodniini e Triatomini. Além disso, as espécies de *Rhodnius* apresentam maior homologia com espécies de *Psammolestes* (tribo Rhodiniini), enquanto as espécies de *Triatoma* exibem grande identidade com *Panstrongylus megistus* (Lyman *et al.*, 1999).

A análise de marcadores moleculares e bioquímicos conjuntamente reforça a hipótese da origem polifilética dos triatomíneos, indicando que, provavelmente, estes insetos originaram-se de um certo número de ancestrais Heteroptera. Além disso corrobora a baixa variabilidade genética nestes insetos especialistas. Concorda ainda com a proposta que a tribo Rhodniini é monofilética.

VI. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite a diferenciação de seis espécies de triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma* (*R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neivai*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*) pelo estudo de sete sistemas enzimáticos (**ME**- Enzima Málica, **EC 1.1.1.40.**; **MDH** – Malato desidrogenase, **EC 1.1.1.37.**; **GPI** - Glicose Fosfato Isomerase, **EC 5.3.1.9.**; **IDH** -Isocitrato Desidrogenase **EC 1.1.1.42.**; **PGM** -fosfoglucomutase **EC 5.4.2.2.**; **GPDH** - α -Glicerofosfato-desidrogenase , **EC 3.4.11.1.**; **SOD** -Superóxido Dismutase, **EC 1.15.1.1.**). As análises de UPGMA e *Bootstrap* nas tribos estudadas corroboram a hipótese evolutiva de distinta ancestralidade entre Rhodniini e Triatomini. Os resultados também reforçam dados sobre variabilidade genética no grupo, caracterizada pela presença de monomorfismo e fixação de alelos distintos nas diferentes espécies.

Este trabalho também permite a detecção de três presumíveis locos esterásicos nas espécies *Rhodnius domesticus*, *R. robustus* e *R. neivai* com diferenciação entre espécies. As análises de similaridade e UPGMA, com base nas esterases, permitiram inferências sobre o grau de proximidade entre as espécies, indicando maior similaridade entre *R. domesticus* e *R. robustus* em relação a *R. neivai*. Estes resultados corroboram a hipótese filogenética proposta para o gênero *Rhodnius*, em que *R. robustus* e *R. neivai* possuem um ancestral comum.



O presente trabalho também revela a variabilidade genética existente na região ITS-1 do DNA ribossômico de oito espécies de triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (*R. domesticus*, *R. robustus*, *R. neivai*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *P. megistus* e *P. herreni*) possibilitando a observação de polimorfismo de tamanho entre as tribos Rhodniini e Triatomini, o que reforça a hipótese de distinta ancestralidade entre estas tribos e origem polifilética dos Triatominae.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa. 1991, 474p.

ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa. 1998, 574p.

ALMEIDA, J. R. Polymorphism of the Alpha-esterase of *Rhodnius prolixus* hemolymph (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Brasil. Biol.*, v. 42, p. 653-654, 1982.

ALTCLAS, J. et al. Chagas disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v. 18, p. 447-448, 1996.

ARAV, R., RIMON, S. Purification and characterization of acetylcholinesterase from bull testes. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 916, p. 313-320, 1987.

BARGUES, M. D. et al. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae), Vectors of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 567-573, 2000.

BARRETO, M. P., RIBEIRO, R. D. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas, 1909. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 39, n. 1, p. 25-36, 1979.

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



BAUR, A. et al. Sequence comparisons of the internal transcribed spacer region of ribosomal genes support close relationships between parasitic ants and their respective host species (Hymenoptera:Formicidae). *Insect Soc.*, v. 43, p. 53-67, 1996.

BEEBE, N. W. et al. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Mol. Biol.*, v. 8, p. 381-390, 1999.

BLACK, W. C.; MCLAIN, D. K.; RAI, K. S. Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (skuase). *Genetics*, v. 121, p. 530-550, 1989.

BLANCO, S. B. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop. Med.Int. Health*, v. 5, p. 293-301, 2000.

BLANGERO-WILLIAMS, S. et al. Genetic epidemiology of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in rural Góias, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 57, n. 5, p. 538-543, 1997.

BONAMETTI, A. M. et al. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em candidatos a doador de sangue. *Rev. Saúde Pública*, v. 32, n. 6, p. 566-571, 1998.

BORGES, E. C. et al. Genetic variability in Brazilian triatomines and the risk of domiciliation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, Suppl. I, p. 371-373, 1999.

BRENIÈRE, S. F. et al. Genetic variability and microdistribution of *Triatoma infestans* genotypes and *Trypanosoma cruzi* clones in Arequipa region (Peru). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 3, p. 401-408, 1997.



- BUNTING, T. E. et al. Identification of *Magnaporthe poae* by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear rDNA ITS-1 regions. *Phytopathology*, v. 86, p. 398-404, 1996.
- CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the triatominae. In: CARCAVALLO et al. *Atlas of Chagas disease vectors in the Américas*. 925-569., Editora: Fio Cruz, Rio de Janeiro, 1999, chap 21, p. 925-980.
- CARDOSO, M. A. G. et al. Relação hospedeiro-parasita na doença de Chagas. *Med. Ribeirão Preto*, v. 28, n. 3, p. 284-303, 1995.
- CARVALHO, M E. et al. Soroprevalência de infecção chagásica de *Triatoma infestans* após medidas de controle. *Rev. Saúde Pública*, v. 34, p. 15-20, 2000.
- CASABÉ, N.; ZERBA, E. N. Esterases of *Triatoma infestans* and its relationship with the metabolism of organophosphorus insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 68, p. 255-258, 1981.
- CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 15, p. 201-203, 1992.
- COCCIOLONE, S. M. , CONE, K. C. PI-Bb, an anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation. *Genetics*, v. 135, p. 575-588, 1993.
- COLEMAN, A. W.; MAI, J. C. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a toll for predicting genetic relatednes. *J. Mol. Evol.*, v. 45, p. 168-177, 1997.
- COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Chagas, um repensar de abordagens experimentais. *Médecus HC-FMUSP*, v. 1, p. 74-77, 1998.



CORNEL, A. J. et al. Ribosomal DNA-polymerase chain reaction assay discriminates between *Anopheles quadriannulatus* and *A. merus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 34, p. 573-577, 1997.

COSTA, J. et al. Isoenzymes detected variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 959-964, 1997.

COURA, J. R.; BARRETE, T. V.; NARANJO, M. A. Ataque a populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica?. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.*, v. 27, n. 4, p. 251-253, 1994.

DE MERIDA A. M. et al. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 53, p. 469-477, 1995.

DELPUECH, J. M.; CARTON, Y.; ROUSH, R. T. Conserving genetic variability of a wild insect population under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 67, 233-239, 1993.

DIAS, J. C. P. Aspectos clínicos, sociais e trabalhistas da doença de Chagas em área endêmica sob controle do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 26, p. 93-99, 1993.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. *Diálogo médico*., v. 4, 1978.

DIAS, J. C. P. et al. Papel dos vetores secundários na transmissão da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, p. 59, 1994.

DOREA, R. C. C. et al. Electroforese de enzimas para estudos de Triatomíneos com referência especial a subpopulações de *Panstrongylus megistus*. *Rev. Bras. Biol.* v. 42, p. 521-526, 1982.

DUJARDIN, J. P et al. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans*. *J. Med. Entomol.*, v. 17, p. 40-45, 1987.

DUJARDIN, J. P. et al. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J. Med. Entomol.* v. 36, p. 653-659, 1999.

DUJARDIN, J. P. et al. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, p. 113-115, 1998a.

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; TIBAYRENC, M. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, n. 1, p. 20-29, 1998b.

DUJARDIN, J. P.; TIBAYRENC, M. Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, v. 65, p. 271-280, 1985.

ELIZARI, M. V. La miocardiopatia chagastica: perspectiva historica. *Medicina, Buenos Aires*, v. 59, p. 25-40, 1999.

FENTON, B. et al. Molecular analysis of ribosomal DNA from the aphid amphorophora idaei and an associated fungal organism. *Insect Mol. Biol.* v. 3, p. 183-189, 1994.

FONTAN, A.; ZERBA, E. Integumental esterase in *Triatoma infestans* and its contribution to the degradation of organophosphorus insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 79, p. 183-188, 1984.



FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 14, p. 265-299, 1980.

FRÍAS, D.; KATTAN, F. Estudio de taxonomia molecular em poblaciones de *Triatoma infestans* (Klug, 1934) y *Triatoma spinolai* Porter 1933, (Hemiptera: Reduviidae). *Act. Entomol. Chil.*, v. 15, p. 205-210, 1989.

FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva. São Paulo:SBG e CNPq, 1986, 631p

GALEL, S. A., KIRCHHOFF, L. V. Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in California blood donors. *Transfusion*, v. 36, p. 227-231, 1996.

GAME, A. G.; OAKESHOTT, J. G. Associations between restriction site polymorphism and enzyme activity variation for esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 126, p. 1021-1031, 1990.

GARCÍA, A. et al.. Estudio clínico y epidemiológico en donantes de sangre seropositivos por trypanosoma cruzi. *Rev. Méd. Chile*, v. 125, p. 905-910, 1997.

GARCÍA, B. A., CANALE, D. M., BLANCO A. Genetic structure of four species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* v. 32, p. 134-137, 1995.

GARCÍA, B. A., SOARES BARATA, J., M., BLANCO, A. Enzyme polymorphism among *Triatoma infestans* (Hemiptera: reduviidae) colonies. *J. Med Entomol.* v. 32, p. 126-133, 1995.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated *Trypanosomas*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 557-565, 2000.



GONÇALVES, T. C. M. et al. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Satal, 1859) and its possible role in the transmission *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena Municipal District, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 711-717, 1998.

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

GRENIER, A., M.; PINTUREAU, B.; NARDON, P. Enzymatic variability in three species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.*, v. 30, p. 201-213, 1994.

GRIJALVA, M. J.; ROWLAND, E. D.; POWELL, M. R. Blood donors in a vector-free zone of Ecuador potentially infected *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 52, p. 360-363, 1995.

GUHL, F.; SCHOFIELD, C. J. Population genetics and control of Triatominae. *Parasitol. Today*, v. 12, 1996.

GUILLEN, G. et. Al. Chagas disease vector control in Tupiza, Southern Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 1-8, 1997.

HARRY, M. Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. *T. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 87, p.492, 1993.

HARRY, M.; GALINDEZ, I.; CARIOU, M. L. Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Med Veterin. Entomol.*, v. 6, p. 37-43, 1992.

HEYMANN, E. Carboxylesterase and amidases. In: *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York:Academic Press, 1980. v. 2, p. 291-323.



HIATT, E. E. et al. Intra-and Interpopulation genome variation in *Meloidogyne arenaria*. *J. Nematol.* v.27, p.143-152, 1995.

HOY, M. A. Insect Molecular Systematics and Evolution, In:____. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications, *California: Academic Press*, 1994, chap.13, p. 337-387.

JOBST, J; KING, K.; HEMLEBEN, V. Molecular evolution of the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. *Mol. Phyl.. Evol.*, v. 9, p. 204-219, 1998.

JUNGE, W. , KLEES, H. Arylesterases. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Wheinhein: Verlachimie, 1984, p. 9-14

KAROTAM J.; OAKESHOTT, J. G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*, v. 71, p. 41-50, 1993.

KASULE, F. K.; COOK, L. M. Phenotypic variability and heterozygosity at an esterase locus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Heredity*, v. 61, p. 427-431, 1988.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas'disease) - A tropical disease now in the United States. *Curr. Concepts*, v. 329, p. 639-644, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680, 1970.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas'disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, v. 163, n. 3, 1979.

LOPEZ, G.; MORENO, J. Genetic variability and differentiation between populations of *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens*, vectors of Chagas's disease in Colombia. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v. 90, p. 353-357, 1995.

LOXDALE, H. D., LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. *Bull. Entomol. Res*, v. 88, p. 577-600, 1998.

LUQUETTI, A. O. Chagas Disease - A recent meeting on practical aspects applied meeting of Chagas Disease 4-6 november 1993, Uberaba, Brazil. *Int. J. Parasitol.* v. 25, p. 869-874, 1995.

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

MANNA, G. K. Chromosomes in evolution in Heteroptera. In: _ Chromosomes in evolution in eukaryotic groups. Florida: Boca Raton, 1995. chap. 8, p. 189-225.

MARCILLA, A. et al. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas Disease. *Mol. Phyl. Evol.*, v. 18, p. 136-142, 2001.

MILLER, B. R.; CRABTREE, M. B.; SAVAGE, H. M. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol. Biol.*, v. 5, p. 93-107, 1996.

MOLYNEUX, D. H.; MOREL, C. Onchocerciasis and Chagas' disease control: the evolution of control via applied research through changing development scenarios. *Br. Med. Bull.* v. 54, p. 327-339, 1998.

MONTEIRO F. A. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Ann. Trop. Méd. Parasitol.* v. 92, p. 887-900, 1998.



MONTEIRO, F. A. et al. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. I, p. 229-238, 1999.

MONTI, J. R. et al. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 Rdna, and its implications. *Mol. Cell. Probe*, v. 12, p. 71-78, 1998

MUTERO, A. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 5922-5926, 1994.

MYERS, M. ; RICHMOND , R. C.; OAKESHOTT, J. G. On the origins of Esterases. *Mol. Biol. Evol.* v. 5, p. 113-119, 1988.

NOIREAU, F. et al. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera:Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop. Med. Int. Health*, v. 3, p. 364-372, 1998.

OAKESHOTT, J. G. et al. Causes and consequences of esterase 6 enzyme activity variation in pre-adult *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, v. 73, p. 160-169, 1994.

OAKESHOTT, J. G. et al. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v. 90, p. 239-268, 1993.

OLIVEIRA FILHO, A. M. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides- implications for Chagas disease vector control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl.1, p. 425-428, 1999.

ONYABE, D. Y.; CONN, J. E. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Insect Mol. Biol.*, v.8, p. 435-442, 1999.



PANZERA, F. et al. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am. J. trop. Med. Hyg.*, v. 57, p. 732-739, 1997.

PARKASH, R.; YADAV, J. P. Geographical clinal variation at seven esterase-coding loci in Indian populations of *Zaprinus indianus*. *Hereditas*, v. 119, p. 161-170, 1993.

PEREIRA, J. et al. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. *Heredity*, v. 77, p. 47-54, 1996.

PETERSEN, D. J. et al. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. *Fund. Appl. Nematol.*, v. 20, p. 619-626, 1997.

PETERSEN, D. J.; VRAIN, T. C. Rapid identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla*, and *M. fallax* using pcr primers to amplify their ribosomal intergenic spacer. *Fund. App. Nematol.*, v. 19, p. 601-605, 1996.

PINTUREAU, B.; GRENIER, A. M.; NARDON, P. Polymorphism of esterases in three species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.*, v. 27, p. 141-151, 1991.

POIRIÉ, M.; RAYMOND, M.; PAUSTEUR, N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) Mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochem. Genet.*, v. 30, 1992.

POLANCO, C. et al. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS



spacer regions: A possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics*, v. 149, p. 243-256, 1998.

PONCE, C. Hacia la eliminacion de la transmision del *Trypanosoma cruzi* en Honduras y los paises de America Central. *Medicina, Buenos Aires*, v. 59, p. 117-119, 1999.

RAMSEY, J. M. et al. Distribution of domestic triatominae and stratification of Chagas disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Med. Vet. Entomol.*, v. 14, p. 19-30, 2000.

REICHE, E. M. V. et al. Seropositivity for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors of the "Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná", Londrina, Brazil (1). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 38, p. 233-240, 1996.

ROSSI, M. A., BESTETTI, R. B. The challenge of Chagasic Cardiomyopathy, *Cardiology*, v. 86, p. 1-7, 1995.

RUVOLLO- TAKASUSUKI, M. C. C., DEL LAMA, M. A., SOARES, A. E. E. Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. *Apidologie*, v. 28, p. 259-267, 1997.

RUVOLLO-TAKASUSUKI M. C. C.; DEL LAMA M. A.; SOARES, A. E. E. Esterase-2 polymorphism in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res*, v. 37, p. 17-22, 1998.

SALLES, N. A. et al. Risk of exposure to Chagas' disease among seroactive Brazilian blood donors. *Transfusion*, v. 36, p. 969-973, 1996.

SAUL, S. H.; GUPTAVANIJ, P.; GRAIG, G. B. JR. Genetic variability at an esterase locus in *Aedes aegypti*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 69, p. 73-79, 1976.

SCHOFIELD, C. J. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. *Bull. Entomol. Res.*, v. 69, p. 363-379, 1979.

SCHOFIELD, C. J. *Trypanosoma cruzi*- The vector-parasite paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 535-544, 2000.

SCHOFIELD, C. J., DUJARDIN, J. P. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual. Biol.*, Medellín, v. 21, p. 183-197, 1999.

SCHOFIELD, C. J.; DOLLING, W. R. Bedbugs and Kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: LANE, R. P., CROSSWKEY, R. W. Medical insects and arachnids. London: Chapman and Hall. 1993, p. 483-516.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the triatominae. In:_. Biosystematics of Haematophagous insects. Oxford: Clarendon Press. 1988, v. 37, p. 284-312.

SHERLOCK, I. A. Epidemiology and Dynamics of the vectorial transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 385-386, 1999.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 33, p. 351-357, 1991.

SILVEIRA, A. C., REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, supl. 3, p. 11-22, 1994.

SILVEIRA, C. A. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. *Saúde no Brasil*, v. 1, p. 212-218, 1983.



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*, v. 94, p. 161-166, 1999.

SOARES, R. P. P.; SANTORO, M. M. α -Glycerophosphate dehydrogenase activity in flight muscle of Triatomine Bugs *Panstrongylus megistus* and *Triatoma sordida*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 707-709, 2000.

SOLANO, P. et al. Isoenzymes as a tool for the identification of *Rhodnius* species (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). *Res. Rev. Parasitol.*, v. 56, p. 41-47, 1996.

STOTHARD, J. R. et al. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull. Entomol. Res.*, v. 88, p. 553-560, 1998.

SWOFFORD, D. L., PAUP 4.0b10- Phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer Associates : Massachusetts, 2001.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). *Genet. Mol. Biol.* v. 21, p. 461-464, 1998.

TOMA, T. et al. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacer. *J. Med. Entomol.*, v. 37, p. 554-558, 2000.



TOWNSON, H.; ONAPA, W. Identification by rDNA-PCR of *Anopheles bwambae*, a geothermal spring species of the *An. gambiae* complex. *Insect Mol. Biol.*, v. 3, 279-282, 1994.

TYRREL, G. J. et al. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 1054-1060, 1997.

USINGER, R. ;WYGODZINSKY, P.; RYCKMAN, R. E. The Biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 11, p.309-330, 1966.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl.1, p. 395-398, 1999.

VALENTE, V. C. et al. Chagas Disease in the Amazon Basin: Association of *Panstrongylus geniculatos* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. *J. Med. Entomol.*, v. 35, p. 99-103, 1998.

WHEN-HSIUNG LI; DAN GRAUR. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates Publishers, 1991, 284p.

WHITE, E. E. et al. DNA diagnostic for *Armillaria* species in British Columbia: within and between species variation in the IGS-1 and IGS-2 regions. *Mycologia*, v.90, p. 125-131, 1998.

WHITTAKER, M. Cholinesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) Methods of enzymatic Analysis, 3 ed. Weinheim: Chemie, 1984. v. 4, p. 52-74.

WHO (World Health Organization) Expert Committee on the Control of Chagas Disease, *Who Technical Report Series 811*, p. 1-95, 1991.



WU, C. C. N.; FALLON, A. M. Analysis of a ribosomal DNA intergenic spacer region from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, v. 7, n.1, p. 19-29, 1998.

YANG, Q.; ZWICK, M. G.; PAULE, M. R. Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Res.*, v. 22, p. 4798- 4805, 1994.



VIII. RESUMO

O presente trabalho analisou os sistemas enzimáticos **ME** - Enzima málica (**EC 1.1.1.40.**), **MDH** - Malato desidrogenase (**EC 1.1.1.37.**), **GPI** - Glicose fosfato isomerase (**EC 5.3.1.9.**), **IDH** - Isocitrato desidrogenase (**EC 1.1.1.42.**), **PGM** -Fosfoglucomutase (**EC 5.4.2.2.**), **GPDH** - α -Glicerofosfato-desidrogenase (**EC 3.4.11.1.**) e **SOD** - Superóxido dismutase (**EC 1.15.1.1.**) em seis espécies de triatomíneos, *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. vitticeps* com o objetivo de se verificar a variabilidade genética entre espécies e gêneros. A análise de UPGMA dos sete locos gênicos e *Bootstrap* observados para estes sistemas enzimáticos corroborou a hipótese evolutiva de ancestralidade distinta entre as tribos Rhodniini e Triatomini. Os resultados também reforçaram dados anteriores sobre a baixa variabilidade genética nos triatomíneos, caracterizada pela presença constante de monomorfismo e fixação de alelos distintos entre as espécies. As esterases (Carboxilesterases E.C.3.1.1.1. e Colinesterases E.C. 3.1.1.8.) analisadas dentro do gênero *Rhodnius*, incluindo *R. domesticus*, *R. robustus* e *R. neivai*, mostraram padrões atribuídos a três presumíveis locos gênicos que permitiram a diferenciação genética entre espécies. As análises de similaridade e UPGMA com base no padrão de esterases indicaram maior proximidade entre *R. domesticus* e *R. robustus* em relação a *R. neivai*, corroborando a hipótese de origem monofilética a para o gênero *Rhodnius*, a qual propõe que *R. robustus* e *R. neivai* possuem um ancestral em comum e que *R. domesticus* é uma espécie derivada de *R. robustus*.

Também foi analisada a variabilidade de regiões intergênicas não codificadoras do DNA ribossômico ITS-1, através da reação de PCR e RFLP, utilizando-se essa região como um marcador molecular para os triatomíneos. Nesta parte foram estudadas além das espécies de *Triatoma* e *Rhodnius* já citadas, mais duas espécies do gênero *Panstrongylus*, *P. megistus* e *P. herreni*. Este estudo corroborou a hipótese de origem polifilética em triatomíneos e permitiu a separação das tribos Triatomini e Rhodiniini através da análise dos polimorfismos de tamanho de região ITS-1. A origem polifilética do grupo também foi reforçada pelas análises das diferentes espécies de cada gênero, demonstrando um maior polimorfismo na tribo Triatomini em relação a Rhodniini. Em conjunto, os presentes estudos enzimáticos e moleculares ampliam o conhecimento sobre a variabilidade intra e interespecífica em triatomíneos e contribuem para o entendimento das suas relações evolutivas.



IX. ABSTRACT

In the present work we analyzed several enzymatic systems such as Malic enzyme, EC 1.1.1.40. (**ME**), Malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37. (**MDH**), Glucose Phosphate isomerase, EC 5.3.1.9. (**GPI**), Isocitrate dehydrogenase, EC 1.1.1.42. (**IDH**), Phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2. (**PGM**), α -Glycerophosphate dehydrogenase, EC 3.4.11.1. (**GPDH**), Superoxido dismutase, EC 1.15.1.1. (**SOD**) by starch gel electrophoresis in six triatomines species, *Rhodnius domesticus*, *R. neivai*, *R. robustus*, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. vitticeps*. The aim of this work was to detect the genetic variability between species and genus. The UPGMA and Bootstrap analysis of seven loci genic observed for these enzymatic systems corroborated the evolutionary hypothesis of different ancestry among the tribes Rhodniini and Triatomini. These results also reinforced previous data in respect to the low genetic variability in triatomines, characterized by monomorphism and allele fixation among the species. The esterase system (Carboxylesterases E.C.3.1.1.1. and Colinesterases E.C. 3.1.1.8.) was analyzed in species of the genus *Rhodnius*, including *R. domesticus*, *R. robustus* e *R. neivai*. These *Rhodnius* species showed esterase patterns that can be correlated to 4 presumably genic loci, allowing the genetic differentiation among them. The similarity analyses and UPGMA indicated a higher proximity between *R. domesticus* and *R. robustus* compared to *R. neivai*, reinforcing the hypothesis of monophyletic origin for the genus *Rhodnius*, which indicates that *R. robustus* and *R. Neivai* possess a common ancestor and that *R. domesticus* is a *R. robustus* derived species.



We also analysed the variability of ribosomal DNA intergenic region ITS-1 by PCR reaction and RFLP, as a molecular marker for triatomines. Besides the *Triatoma* and *Rhodnius* species, we also studied two species of *Panstrongylus* genus, *P. megistus* and *P. herreni*. This study corroborated the poliphyletic hypothesis for the triatomines origin and allowed the separation of Triatomini and Rhodniini tribes by length polymorphism observed in the ITS-1 region. The poliphyletic origin of the group was also reinforced by analysis among species within genus, demonstrating a higher polymorphism for Triatomini tribe compared to Rhodniini. The present enzymatic and molecular studies expand the knowledge concerning to the intra and interspecific variability among triatomines and contributed for understanding the evolutionary relationships in this group.



