

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/07/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

HELOISA PINOTTI

**Estudo molecular e morfométrico de populações silvestres e colônias
laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

Araraquara, SP

2016

HELOISA PINOTTI

**Estudo molecular e morfométrico de populações silvestres e colônias
laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

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

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara, SP

2016

Ficha Catalográfica

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

Pinotti, Heloisa

P657e Estudo molecular e morfométrico de populações silvestres e colônias laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Heloisa Pinotti. – Araraquara, 2016.
64 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de pesquisa em Parasitologia, subárea Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. *Triatoma rubrovaria*. 2. Morfometria geomorfométrica. 3. Filogenia. 4. Triatominae. 5. Cyt b.
6. COI. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

Dedicatória

A minha mãe, Mirian.

**Gratidão por ter me dado a vida e me ensinado a correr atrás do que é importante
para mim.**

A minha tia, Adriana.

Pelo apoio em todos os momentos difíceis e por compartilhar as alegrias da vida.

Eu não vou mudar não
Eu vou ficar são
Mesmo se for só
não vou ceder
Deus vai dar aval sim,
o mal vai ter fim
e no final assim calado
eu sei que vou ser coroado rei de mim”.

Marcelo Camelo

AGRADECIMENTOS

Mãe, a única palavra que sei escrever é GRATIDÃO. Você é a musa que Deus enviou para nortear a minha vida.

Tia Adriana, minha tiririca e ser abençoado, obrigada por todos os momentos já vividos ao seu lado.

Pai, você esteve muito presente na minha mente durante a minha formação. Mesmo sem querer você me ensinou a ser forte e enfrentar a vida.

Aos meus avós, tia Carla e Paulinho, obrigada pelas boas palavras.

Sérgio e Carlos, obrigada pela convivência e pela força.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pela orientação, paciência e por acreditar no meu potencial.

A Secretária de Saúde do Estado do Rio Grande Sul pela colaboração durante o mestrado.

Vagner José Mendonça, obrigada pelos ensinamentos.

Danila Blanco, obrigada pela oportunidade de poder trabalhar com você e de participar da sua vida.

Sueli Gardim, minha salvadora da molecular, obrigada.

Aos colegas de Departamento pela colaboração e apoio.

Agradeço as minhas amigas Heloisa Messa, Verena Gomes, Isabella Vido, Jussara Miranda, Carla Rocha, Renata Muniz, pela amizade, carinho e paciência.

Ao amigo Reginaldo Soares por me mostrar o quanto a vida pode ser positiva e leve.

Aos amigos que o bar me proporcionou, vocês com certeza fizeram meus dias felizes.

Agradeço os anos a mais que passei na UNIARA, hoje sei o quanto foi necessário esse amadurecimento.

Agradecimento especial ao amigo Tiago Belintani, por toda a ajuda e pelas conversas enriquecedoras.

Aos companheiros do laboratório de Parasitologia, obrigada por estarem comigo em todos os meus momentos acadêmicos.

As meninas da Rep Label, as antigas moradoras e as atuais, vocês fizeram a diferença.

Aos muitos que estiveram comigo nesses dois anos, acredito que as pessoas passam por nossas vidas por algum motivo e se estivemos juntos em algum momento com certeza valeu a pena.

Agradeço a Capes pelos dois lindos anos de bolsa.

Aos membros participantes da banca do exame de qualificação desta dissertação: Dr. Marcos Obara e Dr^a. Aline Rimoldi, vocês enriqueceram o meu trabalho.

Aos pesquisadores e professores que aceitaram a indicação para banca avaliadora de defesa desta dissertação: Dr. Marcos Obara, Dr^a Maria Tercília Vilela, Dr. Adriano Mondini, Dr^a Amanda Piovesan, Dr^a Danila Blanco de Carvalho, Dr^a Sueli Gardim e Dr. Vagner José Mendonça.

Amados, o meu eterno

MUITO OBRIGADA!

O desenvolvimento desta dissertação foi financiado pela Capes.

Processo 23038005285/2011-201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COI: citocromo oxidase I do mtDNA.

Cytb: citocromo b do mtDNA.

CTA: Colônia de Triatominae de Araraquara.

CREBIO: Centro de Recursos Biológicos e Biologia genômica.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

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

F: *forward*.

Genbank: banco de dados público de sequências de nucleotídeos.

mtDNA: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

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

R: *reverse*.

TAE: Tris- Acetato-EDTA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo da transmissão e da interação parasita-hospedeiro do protozoário *T. cruzi*. Os números de 1-6 indicam as etapas do ciclo de transmissão: 1- repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 - ato de coçar, o que leva as formas tripomastigotas metacíclicas das fezes à lesão deixada pela picada do vetor; 3-4 – invasão celular e multiplicação das formas amastigotas do *T. cruzi*; 5- rompimento celular e liberação das formas tripomastigotas sanguíneas; 6- ingestão pelo triatomíneo. Fonte: Google.

Figura 2: Área de captura de *Triatoma rubrovaria* no Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: Google Maps.

Figura 3 - Estruturas mensuradas para o estudo morfométrico. A- seis parâmetros da cabeça, B- tórax, C- abdômen

Figura 4: Detalhe da cabeça de adulto fêmea de *T. rubrovaria* com marcação dos seis pontos de referência utilizados como coordenadas na morfometria geométrica.

Figura 5: Representação do alinhamento final conduzido pelo programa BioEdit das sequências dos fragmentos COI e Cytb e de sequências disponíveis no Genbank com seus respectivos números de acesso.

Figura 6: Gráfico referente a média das cabeças de fêmeas silvestres e laboratoriais de *Triatoma rubrovaria*. 1: Vila Nova do Sul; 2: Pinheiro Bonito; 3: Forqueta; 4: Rincão Soares; 5: Vila Kremer; 6: Quaraí CTA 162; 7: Alegrete CTA 234; 8: *Triatoma sordida*.

Figura 7: Gráfico referente a média das cabeças de machos das colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. 1: Vila Nova do Sul; 2: Pinheiro Bonito; 3: Forqueta; 4: Rincão Soares; 5: Vila Kremer; 6: Quaraí CTA 162; 7: Alegrete CTA 234; 8: *Triatoma sordida*.

Figura 8: Gráfico referente a variação canônica das cabeças de fêmeas silvestres laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 9: Gráfico referente a variação canônica das cabeças de machos silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 10: Gráfico correspondente a PCA, detalhando o primeiro e segundo componente principal de fêmeas silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 11: Gráfico correspondente a PCA, detalhando o primeiro e segundo componente principal de machos silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 12: Dendograma filogenético por meio da amplificação e sequenciamento do gene COI correspondente a espécies silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*.

Figura 13: Dendograma filogenético por meio da amplificação e sequenciamento do gene Cytb de espécies silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*.

Figura 14: Filograma da análise bayesiana com inferência da análise combinada de sequências de triatomíneos utilizados para a reconstrução filogenética. Modelos de evolução para cada partição foram GTR + G para Cytb e GTR + I para o COI.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Procedência e data de início das colônias silvestres de *T. rubrovaria* estudadas.

Tabela 02: Procedência e data de início das colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* estudadas.

Tabela 3: Médias e desvios padrões das mensurações de seis parâmetros da cabeça de machos de *T. rubrovaria*.

Tabela 4: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência do comprimento total da cabeça de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey

Tabela 5: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância interna dos olhos de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 6: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância externa dos olhos de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey

Tabela 7: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância do tubérculo antenífero de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 8: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência das distâncias ante-oculares de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 9: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência das distâncias pós-oculares de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 10: Médias e desvios padrões das mensurações de seis parâmetros da cabeça de fêmeas de *T. rubrovaria*.

Tabela 11: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência do comprimento total da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 12: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância interna da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey

.

Tabela 13: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância externa da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 14: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância do tubérculo antenífero da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 15: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância ante-ocular da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 16: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância pós-ocular da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 17: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do tórax de machos de *T. rubrovaria*.

Tabela 18: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do tórax de machos de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

Tabela 19: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do tórax de fêmeas de *T. rubrovaria*.

Tabela 20: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do tórax de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

Tabela 21: Médias e desvios padrões das mensurações de comprimento do abdômen de machos de *T. rubrovaria*.

Tabela 22: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do abdômen de machos de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

Tabela 23: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do abdômen de fêmeas de *T. rubrovaria*.

Tabela 24: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do abdômen de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

SUMÁRIO

Capítulo I – Dissertação de Mestrado.....	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
I. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Doença de Chagas	21
1.2. Os vetores de <i>T.cruzi</i>	23
1.3. Considerações sobre a espécie estudada.....	25
1.3.1. <i>Triatoma rubrovaria</i> (Blanchard, 1843).	25
1.4. Uso da biologia molecular no auxílio à sistemática da subfamília triatominae	26
1.5. Uso da morfometria tradicional e morfometria geométrica no auxílio à sistemática dos triatominae.	27
II. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo Geral.	29
2.2. Objetivos Específicos.	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS.	30
3.1. Insetos	30
3.2. Estudos Morfométricos	32
3.3. Análise da Morfometria Geométrica	33
3.4. Estudos Moleculares.....	34
3.4.1. Extração do DNA	34
3.4.2. Iniciadores (Primers)	34
3.4.3. Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)	35
3.4.4. Purificação dos fragmentos amplificados	35
3.4.5. Sequenciamento do DNA amplificado	36
3.4.6. Análise filogenética	36

3.4.7. Sequências utilizadas	37
IV. RESULTADOS	39
4.1. Análise Morfométrica.....	39
4.2. Morfometria Geométrica	50
4.3. Estudos Moleculares.....	56
4.4. Análise Bayesiana	59
V. DISCUSSÃO.....	60
VI. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO II	67

Capítulo I – Dissertação de Mestrado

RESUMO

A subfamília Triatominae conta com 18 gêneros e 151 espécies, sendo duas fósseis. As espécies são divididas em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini sendo essa última tribo agrupada em oito complexos e oito subcomplexos por suas características morfológicas, citogenéticas e moleculares. *Triatoma rubrovaria* pertence à tribo Triatomini e ao complexo *Triatoma infestans* e pode ser encontrada no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), Uruguai e em algumas regiões da Argentina. *Triatoma rubrovaria* possui hábitos rupestres sendo encontrada em buracos e fendas de locais rochosos, onde predominam rochas graníticas ou areníticas. Essa espécie alimenta-se do sangue de mamíferos, dessa maneira mantém o ciclo silvestre de *Trypanosoma cruzi*. No Rio Grande do Sul *Triatoma carcavalloei*, *Triatoma pintodiasi*, *Triatoma circumamculata* e *T. rubrovaria* podem compartilhar os mesmos ecótopos e apresentam coloração e algumas características morfológicas semelhantes, o que dificulta a identificação. Diante dessa constatação e servindo-se de estudos moleculares, geomorfométricos e morfométricos foram feitos estudos de seis populações silvestres e de cinco colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Para o estudo de seis populações silvestres e de cinco colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* foram utilizadas sequências de genes mitocondriais Citocromo b e Citocromo Oxidase I. Também foram conduzidos estudos morfométricos por microscopia óptica em que se mensurou seis parâmetros da cabeça, comprimento do tórax e abdômen de fêmeas e machos adultos. Por meio de morfometria geométrica foram estudados parâmetros da cabeça utilizando pontos de referência previamente determinados. Os resultados obtidos, por meio de morfometria clássica e morfometria geométrica, mostraram diferenças no fenótipo dessas populações, enquanto o estudo molecular revelou que o genótipo não apresentou mudanças significativas.

Palavras-chave: *Triatoma rubrovaria*. Morfometria. Morfometria geométrica. Filogenia. Triatominae. *Cyt b*, *COI*.

ABSTRACT

Currently, the members of the subfamily Triatominae are represented by 18 genera and 151 species, including two fossils. These species are divided into five tribes: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini and Triatomini which are grouped into eight complexes and eight subcomplexes by their morphological, cytogenetic and molecular characteristics. *Triatoma rubrovaria* belongs to the Triatomine tribe and to the complex *Triatoma infestans* and can be found in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), Uruguay and some regions of Argentina. *Triatoma rubrovaria* has rupestrian habits, being found in holes and crevices of rocky places that are dominated by granite or sandstone rocks. This species feeds on the blood of mammals, maintaining the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*. In Rio Grande do Sul, *Triatoma carcavalloei*, *Triatoma pintodiasi*, *Triatoma circumamculata* and *T. rubrovaria* can share the same ecotypes, color patterns and some similar morphological characteristics, which often becomes difficult to differentiate these species. For this purpose, geomorphometric and morphometric studies were carried out using two wild populations and five colonies of *T. rubrovaria* from the laboratory which are kept in the Insectarium of Triatominae from the Faculty of Pharmaceutical Sciences. The six wild populations and five colonies of *T. rubrovaria* from the laboratory were used to the study of mitochondrial genes Cytochrome b and Cytochrome Oxidase I sequences. Furthermore, morphometric studies were performed by optical microscopy in order to measure six parameters of the head, length of the chest and abdomen of females and adult males. Through geometric morphometric studies were investigated the head parameters using previously determined reference points. The results obtained by classical morphometric and geometric morphometry methods showed differences in the phenotype of these populations, while the molecular study revealed that the genotype showed no significant changes.

Keywords: *Triatoma rubrovaria*. Morphometry. Geomorphometric morphometry. Phylogeny. Triatomine. *Cyt b*, *COI*.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

Em 1909 Carlos Chagas descreveu a tripanossomíase americana. A doença foi descrita pautando-se em pesquisas de campo realizadas no município de Lassance no Estado de Minas Gerais, onde encontrou insetos hematófagos com hábitos noturnos, que habitavam casas de paredes de madeira e barro e cobertas com palha (CHAGAS, 1909).

Carlos Chagas examinou as fezes dos insetos coletados e observou um flagelado do gênero *Trypanosoma*, descrevendo assim, não só o ciclo como o agente etiológico da doença de Chagas, um protozoário, pertencente à ordem Kinetoplastida denominado *Trypanosoma cruzi* que se apresenta sob três formas principais: tripomastigota, forma flagelada com membrana ondulante que não apresenta capacidade reprodutiva, o núcleo é geralmente central; epimastigota, forma flagelada, com capacidade reprodutiva (por divisão binária) no trato digestório do vetor (triatomíneos) e que apresenta o cinetoplasto localizado próximo ao núcleo; amastigota, forma arredondada, sem flagelo livre, com habilidade de multiplicação intracelular (ARGOLO et al., 2008; NOIREAU et al., 2009).

Trypanosoma cruzi quando eliminado nas fezes dos barbeiros se apresenta na forma tripomastigota metacíclica (ocorrente no organismo dos barbeiros). Após a entrada no hospedeiro vertebrado ocorre a infecção das células próximas ao local da picada. Já dentro da célula os tripomastigotas assumem uma forma ovóide chamada amastigota, a qual se multiplica rapidamente. O grande número de parasitos provoca o rompimento celular e os tripanossomídeos entram na corrente sanguínea e no sistema linfático (ARGOLO et al., 2008).

Assumem novamente a forma flagelada, chamados de tripomastigotas sanguíneos (tipo ocorrente nos vertebrados), espalham-se pelo organismo e infectam novas células em outros ciclos (ARGOLO et al., 2008).

Figura 1 – Ciclo da transmissão da doença de Chagas.

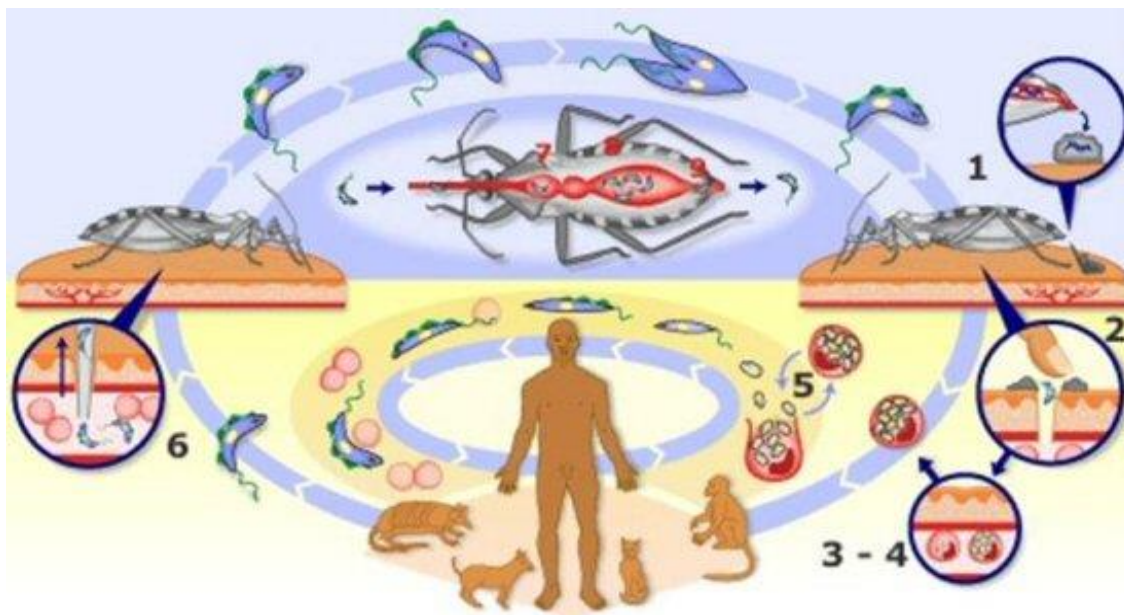


Figura 1: Ciclo da transmissão e da interação parasita-hospedeiro do protozoário *T. cruzi*. Os números de 1-6 indicam as etapas do ciclo de transmissão: 1- repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 - ato de coçar, o que leva as formas tripomastigotas metacíclicas das fezes à lesão deixada pela picada do vetor; 3-4 – invasão celular e multiplicação das formas amastigotas de *T. cruzi*; 5- rompimento celular e liberação das formas tripomastigotas sanguíneas; 6- ingestão pelo triatomíneo. Fonte: Google

A transmissão do parasito *T. cruzi* ocorre principalmente por meio de fezes de triatomíneos que se alimentam de sangue, vivem em fendas e buracos de casas construídas em áreas rurais e suburbanas e são mais ativos à noite, pois, saem em busca de alimento. Além dessa forma o protozoário *T. cruzi* pode ser transmitido por: alimentos contaminados, transfusão de sangue, transmissão congênita, transplante de órgãos e por via oral (WHO, 2015).

A transmissão por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes das fezes de triatomíneos infectados (LEWINSOHN, 2005). Mesmo accidental essa forma de transmissão é considerada endêmica na Amazônia (PINTO et al., 2008; VALENTE et al., 1999; FRAIHA et al., 1995; JUNQUEIRA et al., 2005,). Na cidade de Navegantes, em Santa Catarina, em 2005, ocorreu a infecção de 24 pessoas pela ingestão de caldo de cana, dessas, três evoluíram a óbito. A mesma linhagem de *T. cruzi* foi isolada do sangue dos pacientes infectados, do vetor *Triatoma tibiamaculata* e dos hospedeiros silvestres, gambás das espécies *Didelphis*

aurita e *Didelphis albiventris*, presentes na mata próxima ao local da infecção (STEINDEL, 2008).

Estima-se que cerca de seis a sete milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina. Essa doença encontra-se distribuída em áreas endêmicas de vinte e um países latino-americanos onde, determina um dos maiores problemas de saúde pública. Até 30% das pessoas cronicamente infectados desenvolvem alterações cardíacas e até 10% podem desenvolver alterações digestivas, neurológicas ou mistas (WHO, 2015).

Contudo, é notada uma grande dificuldade em controlar a doença pela falta de tratamento eficaz e pela domiciliação dos vetores que persistem em algumas áreas como casas de pau-a-pique (barro e madeira), criação de animais (galinheiros e currais). Essa domiciliação ocorreu devido a ocupação de ecótopos silvestres pelo homem que acarretaram em desequilíbrios ambientais. Dessa maneira, o ciclo doméstico da doença é bem conhecido e circula entre o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos. Outro fator que dificulta o controle trata-se do ciclo silvestre em que o agente etiológico *T. cruzi* circula entre os triatomíneos e os hospedeiros mais comuns: roedores, quirópteros, carnívoros, marsupiais e primatas, provavelmente os mamíferos contaminam-se pela mucosa do sistema digestor, ao caçar e ingerir os vetores infectados. (ARGOLO, 2008).

Dessa forma, a melhor maneira de prevenção da doença é o combate intensivo a esses vetores de acordo com a área de transmissão geográfica: em regiões originalmente de transmissão como: Bahia, Minas Gerais, Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Tocantins, entre outras, a estratégia é combater a formação de colônias do vetor nos domicílios e também dar assistência aos portadores crônicos da doença. Já na Amazônia Legal (Acre, Tocantins, Roraima, Pará, Amapá, Amazonas) a prioridade é na vigilância precoce de casos agudos e surtos. (FIOCRUZ, 2013).

1.2. Os vetores de *T.cruzi*.

Os insetos da subfamília Triatominae recebem nomes que variam de acordo com as regiões ou países onde são encontrados e são popularmente conhecidos como barbeiros (no

Brasil é o nome mais conhecido e provavelmente nomeado pelo seu hábito noturno de picar a parte do corpo que está descoberta, o rosto). Em outras regiões esse inseto hematófago é conhecido por muitos outros nomes como vinchucas, chirimachas, chupões, procotós e pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, que compreendem insetos da família Reduviidae e da subfamília Triatominae. Esse grupo teve como primeira espécie descrita *Cimex rubrofasciatus*, posteriormente conhecido como *Triatoma rubrofasciata* De Geer, (1773), Laporte (1833) reportadas em (GALVÃO et al, 2014).

Atualmente a subfamília Triatominae conta com 18 gêneros e 151 espécies sendo duas fósseis (GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al, 2016). Essa subfamília é dividida em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini. Nas tribos Rhodniini e Triatomini estão inseridos os três principais gêneros do ponto de vista epidemiológico: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, cujas espécies podem ser reagrupadas em “complexos específicos” devido às semelhança apresentadas, porém esse agrupamento não é reconhecido pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. O “complexo específico” é um conjunto de espécies e subespécies com semelhanças morfológicas, possíveis hibridizações, proximidade molecular, assim como bioquímicas, como, por exemplo, nas análises iso-enzimáticas e por outras abordagens (CARCAVALLO et al, 2001). A completa identificação do vetor facilita a compreensão da capacidade vetorial dos triatomíneos e suas características biogeográficas (CARCAVALLO e JUBERG, 2000).

O gênero *Triatoma* apresenta 73 espécies e é dividido em oito complexos e oito subcomplexos que agrupam os indivíduos por suas características morfológicas, citogenéticas e moleculares. Os complexos são: ‘Phyllosoma, Flavida, Rubrofasciata, Protracta, Lenticularia, Dispar, Infestans e Spinolai e os subcomplexos: Dimidiata, Phyllosoma, Brasiliensis, Infestans, Maculata, Matogrossensis, Rubrovaria e Sordida’ (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).

A espécie estudada neste projeto pertence ao subcomplexo Rubrovaria que faz parte do complexo Infestans e conta com as seguintes espécies: *T. circummaculata*, *T. carcavalloei*, *T. klugi*, *T. oliverai*, *T. pintodiasi*, *T. limai*. (SCHOFIELD & GALVÃO, 2015).

1.3. Considerações sobre a espécie estudada.

1.3.1. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843).

Em 1843, Blanchard descreveu o *Triatoma rubrovaria*, espécie encontrada em 60 municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), nas províncias em Misiones, Corrientes e Entre Rios (Argentina) e em todas as regiões do Uruguai (Rosa *et al*, 2000). *Triatoma rubrovaria* possui hábitos rupestres sendo encontrado em buracos e em afloramentos rochosos, onde predominam rochas graníticas ou areníticas, essa espécie alimenta-se do sangue de roedores, dessa maneira mantém o ciclo silvestre da doença. (ALMEIDA *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2006; MELLO & FIGUEIREDO, 2013).

Essa espécie, em geral, é negra com marcações no pescoço, pronoto, cório e conexivo de cor laranja, vermelho ou amarelo. Seu tamanho varia entre os gêneros, macho apresenta de 21 a 24 mm e a fêmea entre 22 a 25 mm. Suas pernas são escuras e delgadas e seu abdome é largo em alguns indivíduos (MELLO & FIGUEIREDO, 2013).

Devido a relevância de *T. rubrovaria* na veiculação de *T. cruzi* ao homem é importante o reconhecimento desse táxon, assim como a correta identificação desse triatomíneo beneficia as estratégias de controle ao vetor em áreas de risco (ROSA *et al.*, 2000).

Segundo CARDOZO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2014, no Estado do Rio Grande do Sul são encontradas espécies como o *T. caracalloyi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* que são consideradas espécies simpátricas, habitam os mesmos ambientes e possuem hábitos alimentares variados, com intervalos irregulares na sua alimentação e grande resistência ao jejum. A caracterização de espécies silvestres é importante para avaliar a eficiência desses insetos enquanto vetores de *T. cruzi*, pois, essas espécies invadem constantemente locais onde ocorrem edificações humanas.

Uma nova espécie críptica com relação a *Triatoma circummaculata* foi descrita dentro do complexo *T. rubrovaria*, por meio de análises morfocromáticas, bioquímicas e morfométricas, *Triatoma pintodiasi* que difere nos padrões cromáticos e possui diferenças

morfológicas como coloração do lobo posterior do pronoto e nas estruturas fálicas quando comparado as outras espécies do complexo. A espécie foi encontrada até o momento no Rio Grande do Sul em ambientes pedregosos (JUBERG et al., 2013). Portanto, para a identificação correta de *T. rubrovaria* há que se atentar para não confundi-la com *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi* e *T. pintodiasi*.

Triatoma klugi é uma espécie originalmente encontrada em fendas de rochas sem ou com escassa vegetação no Estado do Rio Grande do Sul. Por apresentar características morfológicas semelhantes com *T. oliverai* a espécie foi incluída até então no complexo Oliverai que compreendia as seguintes espécies: *T. matogrossensis*, *T. oliverai*, *T. williami*, *T. guazu* e *T. jurbergi* (Carcavallo et al, 2001). Posteriormente, SCHOFIELD e GALVÃO, 2009 sugeriram que o complexo Infestans teriam na verdade seis subcomplexos incluindo o “subcomplexo rubrovaria” composto por *T. klugi* e *T. oliverai*.

1.4. Uso da biologia molecular no auxílio à sistemática da subfamília triatominae

As informações baseadas na genética dos organismos, provenientes de DNA, podem ser úteis para a identificação correta e na geração de conhecimento dos padrões naturais (correta distribuição geográfica de uma espécie e a variabilidade genética de suas populações) que servirão de base para o entendimento de processos evolutivos (formação de barreiras de isolamento reprodutivo, eventos de especiação ou ainda resistência vetorial aos inseticidas) (GALVÃO et al., 2014). O estudo do DNA de populações de *T. rubrovaria* tem o propósito de sanar dúvidas com relação às populações silvestres e laboratoriais.

Os genes mitocondriais são ferramentas eficazes para a avaliação genética de populações intraespecíficas de triatomíneos. O gene citocromo b mostrou-se útil para estudos filogenéticos de Triatominae, possui uma herança materna e sua taxa de mudança é bem mais rápida que o DNA nuclear (LYMAN et al., 1999). O citocromo oxidase I é utilizado por estar entre os genes mais conservadores que codificam genomas mitocondriais de animais invertebrados (FOLMER, 1994).

1.5. Uso da morfometria tradicional e morfometria geométrica no auxílio à sistemática dos triatominae.

A morfometria pode ser definida como o estudo da forma e tamanho e de como essas variáveis se relacionam, a morfometria se tornou uma ferramenta para entender melhor a relação dessas com outras variáveis, como, por exemplo, sexo e as relações históricas entre os organismos estudados (MORAES, 2003).

A morfometria tradicional é o estudo da variação e covariação de medidas de distância, sejam estas entre pares de pontos anatomicamente homólogos, ou entre pontos de tangência ou extremos de estruturas, ou seja, é o estudo de como e quanto estas medidas variam, e de como e quanto estão relacionadas entre si (MORAES, 2003).

Inicialmente os estudos sobre a variação das formas eram feitos um a um por várias medidas, porém, mesmo com as várias medidas não era possível descrever a forma como um todo, já que os organismos são multidimensionais (MORAES, 2003).

Foi por meio dessa necessidade que surgiram métodos multivariados usados atualmente, que levam em consideração, os diferentes níveis de variação e covariação dessas medidas. A crescente facilidade de acesso às técnicas computacionais fez com que as técnicas multivariadas tradicionais fossem amplamente usadas em estudos de ecologia, sistemática e evolução, e incluem técnicas bem estabelecidas, como Análise de Componentes Principais, Análise de Fatores, Regressões Múltiplas e Análises Discriminantes, entre outras (MORAES, 2003).

Uma nova abordagem morfométrica surgiu no início dos anos 90, essa nova metodologia chamada de morfometria geométrica é usada para representar as formas estudadas e localizar, por meio de gráficos, as regiões onde ocorrem as mudanças. A geomorfometria é baseada em pontos de referência, denominados marcos anatômicos ou *landmarks*. Esses marcos são pontos de correspondência presente em cada objeto que coincide com a população estudada (SILVEIRA, 2011).

A morfometria faz parte de uma área completamente nova, sendo reconhecida apenas nos últimos anos e, atualmente, muito usada em análises taxonômicas e sistemáticas, apresentando vantagens com relação à morfometria tradicional (SILVEIRA, 2011).

A maior contribuição da morfometria geométrica é na diferenciação de espécies, a rapidez na captura de imagem, o baixo custo do processo e o material podem ser obtidos tanto de exemplares secos como frescos. A morfometria geométrica é uma ferramenta de baixo custo e permite alto grau de confiança para a diferenciação de espécies (SILVEIRA, 2011).

VI. CONCLUSÃO

- A morfometria clássica mostrou que há diferença entre machos e fêmeas das colônias silvestres e de laboratório
- A morfometria geométrica apresenta diferenciações de colônias silvestres para colônias de laboratório nos três aspectos analisados: centroide, variação canônica e dos componentes principais.
- Os marcadores pertencentes ao DNA mitocondrial Cytb e COI, devido ao seu polimorfismo, mostraram-se marcadores eficientes para a concatenação de dados e análise bayesiana.
- Pelas análises feitas, não foram observadas mudanças no genótipo das colônias silvestres e de laboratório.

REFERÊNCIAS

- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora, 2008. 63 p.
- BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18s rDNA Sequences. **Mol. Biol. Evol.** v. 14, n. 5, p. 569-577, 1997.
- CARCAVALLO, R.U. et al. Nova espécie do complexo oliverai (nova denominação para o complexo matogrossensis) (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n.1, p.71-79, 2001.
- CARCAVALLO, R.U.; JUBERG, J. T. baratai sp.n. do Estado do mato Grosso do Sul, Brasil (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*). **Entomol. Vectors**, v.7, p. 373-387, 2000.
- CARDOZO DE ALMEIDA, M.; NEVES, S.C.; ALMEIDA, C.E.; LIMA, N.R.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS MALLETT, J.R.; GONÇALVES, T.C. Biology of *Triatoma carcavalloi* Juberger, Rocha & Lent 1998 under laboratory conditions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.47, n.3, p.307-312, 2014.
- CHAGAS, C.J.R. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.
- DUJARDIN, J.P. et al. Changes in the sexual dimorphism of *Triatominae* in the transition from natural to artificial habitats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.565-569, 1999.
- FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acesso em: 11 jan. 2016.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**, 1994.
- FRAIHA NETO, H.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; PINTO, A.Y.N. Doença de Chagas - Endêmica na Amazônia. **An. Acad. Med. (Pará)**, v. 6, p. 53-57, 1995.
- JUBERG, JOSÉ ET AL. *Triatoma pintodiasi* sp. Nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*). **Rev. Pan-Amaz Saúde**, v. 4, n.1, p.43-56, 2013.

JUNQUEIRA, C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends. Parasitol.**, v. 21(6), p. 270-272, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol** v16, n.2, p. 111-20, Dec 1980. ISSN 0022-2844.

LEWINSOHN R 2005. Do caldo de cana ao suco de açaí. **Jornal da Unicamp** 283: 2p.

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.

MARTINS, P. A. M., CASTANHO, R. E. P., CASANOVA, C., CARAVELAS, D. T., FRIAS, G. T., RUAS - NETO, A. L. & ROSA, J. A. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 39, n. 2, p. 198-202, 2006.

MELLO, FERNANDA DE & FIGUEIREDO, MARIA ISABEL. **Guia de Identificação de Triatomíneos do Rio Grande do Sul**, 2013.

MONTEIRO FA, BARRETT TV, FITZPATRICK S, CORDÓN- ROSALES C, FELICIANGELI D BEARD CB 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Mol Ecol** 12: 997-1006.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P., JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to 32 its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v.40, n.2, p.26, 2009.

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

PINTO AYN, VALENTE SAS, VALENTE VC, FERREIRA-JUNIOR AG, COURA JR 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Rev Soc Bras Med Trop** 41: 602-614.

ROSA, J.A. DA, BARATA, J.M.S., SANTOS, J.L.F.; CILENSE, M.. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Saúde Pública** v. 34, n.5, p. 538-542, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol 1,2 and 3, 1989

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

STEINDEL, M.; PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; PINTO, C.J.C. & GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2008.

VALENTE SAS, VALENTE VC, FRAHIA NETO H 1999. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas`disease in the Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94: 395-398.

WHO. Doença de Chagas (tripanossomíase americana). **Geneva, 2016.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em: 03 Ago. 2015.