

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/01/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU (IBB/UNESP)
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

Ariane Cristina Caris Garcia

**Especiação x Especiação críptica: o caso de *Triatoma sordida* (Stål,
1859) (Hemiptera, Triatominae)**

Botucatu

2021

Ariane Cristina Caris Garcia

Especiação x Especiação críptica: o caso de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia) junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Coorientador: Dr. Jader de Oliveira

Botucatu

2021

G216e	Garcia, Ariane Cristina Caris Especiação x Especiação críptica: o caso de <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) / Ariane Cristina Caris Garcia. -- Botucatu, 2021 43 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi Coorientador: Jader Oliveira 1. Barbeiro (Inseto). 2. Microscopia eletrônica de varredura. 3. Morfometria. 4. Evolução (Biologia). 5. Doença de Chagas. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ariane Cristina Caris Garcia

**Especiação x Especiação críptica: o caso de *Triatoma sordida* (Stål, 1859)
(Hemiptera, Triatominae)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia) junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
FCFAR/UNESP
Orientador

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
IBILCE/UNESP

Prof. Dr. Cleber Galvão
IOC/FIOCRUZ

Botucatu
2021

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que se mantêm presentes, meus amigos, familiares e amigos que já se tornaram minha família, obrigada pelo apoio.

Dedico especialmente para a minha mãe, Celia, que sempre sonhou que eu iria longe, que fez o possível e o impossível e nunca mediu esforços para que eu pudesse estudar e me dedicar para chegar até aqui, mesmo com muitas dificuldades e inúmeras adversidades, alcançamos mais esta vitória. Mãe, todo seu esforço está aqui, obrigada por tudo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus primeiramente, por me dar forças para continuar e chegar até aqui.

Agradeço a minha mãe, Celia, por sempre me incentivar a estudar, por batalhar tanto, todos os dias, para que isso fosse possível. Por todos os ensinamentos de vida, por me deixar ser quem eu quero e me apoiar mesmo quando não gosta das minhas decisões.

Agradeço a minha avó, dona Iolanda (ioiô), pelo carinho, amor e brigas, pelo tempo que passamos no jardim cuidando das plantinhas, esse tempo me ajudou a colocar muitas coisas em perspectiva.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, que desde a graduação teve imensa paciência, dedicação e compreensão. Obrigada pelos ensinamentos, parceria, risadas e cantorias que tornaram o caminho muito mais alegre, leve e sempre muito engraçado. Muito obrigada por apoiar minha decisão de seguir um novo caminho, mas também por manter a porta sempre aberta para que eu possa voltar!

Ao meu coorientador, Dr. Jader de Oliveira, por toda a dedicação e ensinamentos.

Agradeço aos membros da banca, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Prof. Dr. Cleber Galvão pelo apoio em diversos trabalhos.

Aos meus amigos, pela compreensão quando eu me desligava de tudo para ter foco e por simplesmente me apoiarem em todas as minhas decisões, vocês são poucos, mas sei que posso contar com cada um sempre.

À toda a equipe do laboratório de Biologia Celular (IBILCE/UNESP) e do laboratório de Parasitologia (FCFAR/UNESP), pela ajuda e dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa de mestrado.

Muito obrigada!

“Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar o nosso destino, se nos dedicarmos à luta para a realização de nosso ideal.”

Vladimir Ilyich Ulianov (Lenin)

Sumário

Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos gerais.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. RESULTADOS (apresentados na forma de artigo científico).....	14
3.1 Artigo científico.....	14
Abstract.....	16
Background.....	17
Results.....	19
Discussion.....	26
Conclusions.....	29
Methods.....	29
Ethics approval and consent to participate, Consent for publication, Availability of data and materials, Competing Interest.....	30
Funding, Author's contribution, Acknowledgments.....	31
References	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

Resumo

Triatoma sordida é uma espécie endêmica da América do Sul, distribuída no Brasil, na Argentina, na Bolívia, no Paraguai e no Uruguai. Diversos estudos (cromossômicos, meióticos, isoenzimáticos e moleculares) sinalizaram polimorfismo e sugeriram que tenha ocorrido o fenômeno de especiação críptica em *T. sordida*, destacando que existem, pelo menos, duas possíveis espécies diferentes associadas à *T. sordida sensu stricto*, a saber, *T. sordida* Argentina (descrito recentemente como *T. rosai*) e *T. sordida* La Paz. Levando em consideração que o conceito de especiação críptica está pautado em espécies morfológicamente indistinguíveis que foram classificadas dentro de apenas um táxon nominal e, principalmente, que existem vários erros associados com a caracterização de espécies crípticas, a avaliação subjetiva das similaridades morfológicas e a falta de utilização de abordagens combinadas pode resultar na caracterização errônea desses táxons. Embora os estudos assumam que o processo de especiação que suporta a diferenciação de espécies dentro de *T. sordida* seja resultado da especiação críptica, estudos morfológicos são necessários para comprovar esse evento evolutivo, pois a única comparação morfológica entre *T. sordida* do Brasil, da Bolívia e da Argentina (*T. rosai*) foi realizada a partir da morfometria geométrica da asa. Diante disso, a presente dissertação teve como objetivo investigar a diversidade e descrever as características fenotípicas de *T. sordida* proveniente da Bolívia, Brasil, Paraguai e *T. rosai* (populações anteriormente consideradas como *T. sordida* da Argentina). Análises morfológicas e morfométricas foram realizadas e diferenças morfológicas no tórax e na genitália externa feminina, bem como diferenças morfométricas nas estruturas do tórax, abdômen, pronoto, escutelo e da cabeça foram observadas entre as populações alopátricas de *T. sordida* e *T. rosai*. Com base no exposto, fica evidente que o processo evolutivo que sustenta, até o momento, as divergências observadas para *T. sordida* não se fundamenta em especiação críptica.

Palavras-chave: Triatomíneos; Morfologia; Morfometria; Doença de Chagas

Abstract

Triatoma sordida is an endemic species in South America, distributed in Brazil, Argentina, Bolivia, Paraguay, and Uruguay. Chromosomal, molecular, isoenzymatic, and cuticular hydrocarbon pattern studies indicated polymorphisms and suggested cryptic speciation in *T. sordida*, highlighting that there are at least two possible different species associated with *T. sordida sensu stricto*, named *T. sordida* Argentina (recently described as *T. rosai*) and *T. sordida* La Paz. Considering the concept of cryptic species/speciation, based on morphologically indistinguishable species classified within only a nominal taxon, and the many mistakes associated with cryptic species characterization, the subjective evaluation of morphological similarities and lack of combined approaches may lead to the wrong characterization of these taxa. Although all authors assume that the speciation process supporting these differentiations in *T. sordida* is the result of cryptic speciation, further morphological and/or morphometric studies are necessary to prove the application of this evolutionary event, since the only comparison made among *T. sordida* from Brazil, Bolivia, and Argentina (*T. rosai*) analyzed the wing morphometric geometry. Based on this, the present dissertation aimed to describe phenotypical characteristics of *T. sordida* from Brazil, Bolivia, Paraguay and *T. rosai* (populations previously considered to be *T. sordida* from Argentina) to assess if the cryptic speciation is indeed the evolutionary event responsible for the possible new taxa differentiation associated with *T. sordida*. Morphological and morphometric analyses were performed and morphological differences in the thorax and female external, as well as morphometric differences in the head, thorax, abdomen, pronotum, and scutellum structures, were observed among the allopatric populations of *T. sordida* and *T. rosai*. Based on this, is evident that the evolutionary process that supports, so far, the divergences observed for *T. sordida* is not cryptic speciation.

Keywords: Chagas disease vector, triatomines, morphology, morphometry, evolution

1. INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) são insetos hematófagos de grande importância para a saúde pública, pois são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2019), a qual atinge cerca de oito milhões de pessoas e coloca em risco de infecção, aproximadamente, 25 milhões de pessoas no mundo, sendo o tratamento com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) efetivos apenas na fase aguda da doença (WHO, 2019).

Atualmente, existem 156 espécies descritas na subfamília Triatominae (sendo 153 espécies vivas e três espécies fósseis), agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2020; GALVÃO, 2020; ZHAO et al., 2021). Embora existam espécies com maior ou menor grau de importância na transmissão da doença de Chagas [com destaque para *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* (Neiva, 1911), *T. pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964) e *T. sordida* (Stål, 1859), que apresentam maiores competências vetoriais no Brasil (GALVÃO, 2014)], todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão (N1, N2, N3, N4, N5 e adultos), são considerados como potenciais vetores dessa doença.

Triatoma sordida é uma espécie endêmica da América do Sul, distribuída no Brasil, na Argentina, na Bolívia, no Paraguai e no Uruguai (GALVÃO, 2014). Embora seja considerada predominantemente peridomiciliar, apresenta capacidade de colonizar domicílios e formar colônias intradomiciliares, o que pode ser potencializado pela capacidade de dispersão (DANTAS et al., 2018), destacando-a entre as prioridades para campanhas de controle de vetores no Brasil, principalmente em áreas de ocupação agrícola nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás em que os índices de captura de *T. sordida*

têm preocupado as autoridades de saúde (DIOAIUTI et al. 1995; SILVA et al. 2005; OLIVEIRA e SILVA 2007).

Essa espécie, em conjunto com *T. patagonica* (Del Ponte, 1929), *T. guasayana* (Wygodzinsky & Abalos, 1949) e *T. garciabesi* (Carcavallo et al. 1967), foi agrupada no subcomplexo *T. sordida* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009). Contudo, diversos estudos sinalizam polimorfismo em *T. sordida*: Panzera et al. (1997) observaram variação cromossômica para o padrão de heterocromatina constitutiva e no comportamento meiótico para *T. sordida* proveniente do Brasil e da Argentina; Noireau et al. (1998), com base em análises isoenzimáticas relataram alta distancia genética e sugeriram especiação críptica para *T. sordida* de diferentes localidades da Bolívia; Panzera et al. (2015), com base em dados cromossômicos (padrão de heterocromatina constitutiva e marcação por FISH com sondas de DNAr 45S) e moleculares (gene mitocondrial COI) também apontam para o fenômeno de especiação críptica em *T. sordida*, destacando que existem, pelo menos, duas possíveis espécies diferentes associadas a *T. sordida* sensu stricto, a saber, *T. sordida* Argentina e *T. sordida* La Paz. Alevi et al. (2020), com base em estudos de taxonomia integrativa, descreveram *T. rosai* Alevi et al., 2020 a partir de *T. sordida* Argentina.

O conceito de especiação críptica está pautado em espécies morfologicamente indistinguíveis (pelo menos, superficialmente) que foram classificadas dentro de apenas um táxon nominal (BICKFORD et al., 2007). Esse conceito foi erroneamente considerado como sinônimo de espécies irmãs, as quais conotam apenas ancestralidade comum e não necessariamente relação morfológica (SAEZ e LOZANO, 2005; BICKFORD et al., 2007). Além disso, espécie críptica também foi associada de forma errada com eventos recentes de especiação que não resultaram na fixação de diferenças morfológicas (KNOWLTON, 1993; GUSTAFSSON et al., 2014; STRUCK et al., 2018).

Espécies crípticas, de forma geral, são espécies pouco diferenciadas do ponto de

vista morfológico que, embora representem linhagens evolutivas distintas (isoladas reprodutivamente), são historicamente interpretadas como membros de uma única espécie (BICKFORD et al., 2007). O uso inadequado do termo “espécie críptica” gera ambiguidade taxonômica e evolutiva (STRUCK et al., 2018). O conceito mais utilizado [descrito por Bickford et al. (2007)] é considerado insatisfatório por apresentar problemas relacionados com questões biológicas ou taxonômicas que podem acarretar na caracterização equivocada de novas espécies (STRUCK et al., 2018). Além disso, Struck et al. (2018) destacam que a avaliação subjetiva das similaridades morfológicas e a falta de utilização de abordagens combinadas (muitos estudos caracterizaram esse evento evolutivo com base em apenas um marcador molecular) também resultam em problemas na caracterização de espécies críptica, pois alguns estudos assumem que nos estágios iniciais da especiação as características fisiológicas, imunológicas, reprodutivas ou comportamentais são as que atuam na diferenciação das espécies (BENSCH et al., 2004; DAMM et al., 2010; DERYCKE et al., 2016).

Do ponto de vista cromossômico, molecular, izoenzimático e pelo padrão de hidrocarbonetos cuticulares, *T. sordida* se diferencia em mais de um táxon (PANZERA et al., 1997, 2015; NOIREAU et al., 1998; CALDERÓN-FERNÁNDEZ e JUÁREZ, 2013; ALEVI et al., 2020). Contudo, embora todos os autores assumam que o processo de especiação que suporta essa diferenciação de espécies dentro de *T. sordida* seja resultado da especiação críptica, estudos morfológicos são necessários para comprovar esse evento evolutivo, pois a única comparação morfológica realizada em *T. sordida* proveniente de diferentes países (Brasil, Bolívia e Argentina) foi realizada por Nattero et al. (2017) que diferenciaram a população de *T. sordida* da Argentina [descrita como *T. rosai* (ALEVI et al., 2020)] dos exemplares provenientes do Brasil e da Bolívia a partir de dados morfométrico da asa e ressaltam a importância de estudos adicionais para confirmar a

validade específica do(s) novo(s) táxon(s). Além disso, com base na diferenciação fenotípica de *T. rosai* (caracterizada no manuscrito como *T. sordida* da Argentina) quando compara as outras localidades de *T. sordida*, Nattero et al. (2017) sugerem que a(s) nova(s) espécie(s) putativa de *T. sordida* pode(m) não ser críptica(s).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar e descrever a diversidade de *T. sordida* ao longo de sua distribuição geográfica na Bolívia, Brasil, Paraguai e Argentina (*T. rosai*), por meio de análises morfológicas e morfométricas.

2.2 Objetivos específicos

- a)** Analisar a morfologia comparativa do tórax e do abdômen, bem como da genitália feminina de *T. sordida* da Bolívia, Brasil, Paraguai e Argentina (*T. rosai*);
- b)** Avaliar os aspectos morfométricos comparativos da cabeça, do tórax e do abdômen de

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEVI, K.C.C., et al. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. *Insects*, n. 11, p. 830, 2020.

BENSCH, S. et al. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution*, v. 58, p. 1617-1621, 2004.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.

CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G.M., JUÁREZ, M.P. The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 6, p. 778-784, 2013.

DAMM, S. et al. An integrative approach to species discovery in odonates: from character- based DNA barcoding to ecology. *Molecular ecology*, v. 19, n. 18, p. 3881-3893, 2010.

DANTAS, E. S., et al. Should I stay or should I go? Movement of adult *Triatoma sordida* within the peridomestic area of a typical Brazilian Cerrado rural household. *Parasites & Vectors*, v. 11, p. 14, 2018.

DERYCKE, S. et al. Coexisting cryptic species of the *Litoditis marina* complex (Nematoda) show differential resource use and have distinct microbiomes with high intraspecific variability. *Molecular ecology*, v. 25, n. 9, p. 2093-2110, 2016.

DIOTAIUTI, L. et al. Avaliação do programa de controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referência especial ao *Triatoma sordida*. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 118 (3), mar. 1995, 1995.

GALVÃO, C. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores* (1º ed.)

(OLIVEIRA, J., ALEVI, K.C.C., CAMARGO, L.M.A., MENEGUETTI, D.U.O., ed.). pp 9–37, Stricto Sensus Editora, 2020.

GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. 2014.

GUSTAFSSON, A.L.S. et al. Genetics of cryptic speciation within an arctic mustard, *Draba nivalis*. PloS one, v. 9, n. 4, p. e93834, 2014.

KNOWLTON, N. Sibling species in the sea. Annual review of ecology and systematics, v. 24, n. 1, p. 189-216, 1993.

NATTERO J. et al. Morphometric variability among the species of the *Sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. Parasites & vectors, v. 10, n. 1, p. 412, 2017.

NOIREAU, F. et al. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. Tropical medicine & international health: TM & IH, v. 3, n. 5, p. 364-372, 1998.

OLIVEIRA, A.W., SILVA, I.G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. Rev Soc Bras Med Trop, v. 40, n. 2, p. 204-8, 2007.

PANZERA, F. et al. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. Parasites & Vectors, v. 8, n. 1, p. 495, 2015.

PANZERA, F. et al. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 57, n. 6, p. 732-739, 1997.

SAEZ, A.G., LOZANO, E. Body doubles. Nature, v. 433, n. 7022, p. 111-111, 2005.

SCHOFIELD, C. J., GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

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

STRUCK, T.H. et al. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 33, n. 3, p. 153-163, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 20 de maio de 2019.

ZHAO, Y., et al. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys*, n. 1012, p. 71–93, 2021.