

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

TIAGO BELINTANI

**Filogenia do subcomplexo *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae),
por meio de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares**

Araraquara

2016

TIAGO BELINTANI

Filogenia do subcomplexo *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), por meio de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Parasitologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara

2016

Belintani, Tiago
B431f Filogenia do Subcomplexo *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), por meio de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares / Tiago Belintani. – Araraquara, 2016. xxi + 96 f. : Il.

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.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. *Triatoma sordida* (Subcomplexo). 2. Morfometria molecular. 3. Filogenia. 4. Triatominae. 5. Morfologia. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

TIAGO BELINTANI

Filogenia do subcomplexo *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae),
por meio de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia, área de concentração:
Parasitologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 11 de outubro de 2016.

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara – UNESP/FCFAR

Dr. Cleber Galvão Ferreira

Instituição: Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de
Triatomíneos da / Fundação Oswaldo Cruz –IOC/Fiocruz.

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Instituição: Departamento de Biologia do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas do
Campus de São José do Rio Preto –IBILCE-UNESP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara.

AGRADECIMENTOS

A minha companheira Camila Azevedo pelo amor, compreensão, paciência e por toda colaboração.

Aos meus familiares, Pai, Mãe, meus irmãos, suas companheiras e sobrinhos.

Ao Prof. Dr João Aristeu da Rosa do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Araraquara, pela orientação e pelas inúmeras colaborações que ajudaram para conclusão desse trabalho, bem como para meu crescimento profissional e pessoal.

A Prof^a, Dr^a Mara Cristina Pinto do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Araraquara, pelas sugestões, amizade e por todo apoio na realização do trabalho.

Ao Prof. Dr Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, por todo apoio e pela doação de espécimes que tornaram o trabalho viável.

A Prof. Dr. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto-SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (IBILCE/UNESP), pelas colaborações com nosso grupo de pesquisa e principalmente pela participação na minha banca de mestrado.

Agradeço *in memoriam* ao Prof. Tit. José M.S Barata pela dedicação na manutenção dos ovos que estão hoje depositados na coleção de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP- Araraquara/SP.

Ao programa de Pós- graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Araraquara, e seus colaboradores por todo auxílio e compreensão.

As técnicas do laboratório Izabel Martinez e Therezinha Aparecida Ricci pelo apoio técnico e pela convivência.

Aos amigos de pesquisa por toda ajuda e pela convivência diária, Aline, Dennys, Vicente, Wanderson, Flavia, Danila, Sueli, Éder, Thais, Mariana, Fabio.

Ao amigo Jader Oliveira pela amizade, colaboração e por toda ajuda, e principalmente pelos momentos de descontração.

Ao amigo Lucas Abrantes da Silva pela amizade, ajuda, inúmeras colaborações e risadas.

A Heloisa Pinotti por toda ajuda, amizade e colaborações.

A Juliana Damieli Nascimento pelas colaborações, apoio e pela amizade.

Aos colaboradores do Laboratório de Processamento Histológico da Faculdade de Odontologia – UNESP/ Araraquara, por todo apoio. Especialmente ao técnico Pedro.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por todo apoio.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan (1934-1996) cientista, astrônomo e divulgador científico.

RESUMO

Triatoma garciabesi, *Triatoma guasayana*, *Triatoma patagonica* e *Triatoma sordida* constituem o subcomplexo *T. sordida*, triatomíneos que podem veicular *Trypanosoma cruzi* e determinar doença de Chagas em humanos. Assim devido a importância epidemiológica foi conduzido este estudo que pode contribuir para o controle vetorial. A filogênese do subcomplexo *T. sordida* foi conduzido por meio de estudos do processo mediano do pigóforo, genitália externa feminina, histologia de ovos, morfometria de ovos e morfometria geométrica de asas. Também se utilizou dos marcadores moleculares CO1, *Cyt b*, 16S e 28S. Os resultados obtidos corroboram as descrições da literatura e fornecem novos parâmetros para a caracterização das quatro espécies do subcomplexo *T. sordida*, bem como das relações filogenéticas da subfamília *Triatominae*. O estudo do processo mediano do pigóforo de *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T. sordida* por meio de MEV não mostrou diferenças entre as três espécies. A genitália externa feminina de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* observadas por MEV, apresentaram diferenças que possibilitam distinguir essas espécies. O estudo morfológico dos ovos por meio de MEV possibilitou descrever as características do exocório das quatro espécies, mas apresentou pouca eficácia para discriminação. O estudo histológico revelou diferenças na constituição tissular dos exocórios das quatro espécies. O estudo morfométrico de ovos mostrou que as variáveis de comprimento e abertura opercular dos ovos apresentam diferenças significativas entre as espécies, a variável largura não foi significativa. Por meio da morfometria das asas foi possível diferenciar as espécies e os valores resultantes do tamanho do centroide mostraram diferenças no tamanho das asas, assim como consistente dimorfismo sexual. As variáveis canônicas resultaram em sete variáveis que explicaram 100% das diferenças. A CV1 e CV2 apresentaram maior poder discriminante, gerando agrupamentos claramente definidos. A variabilidade de forma e tamanho das asas foram observadas pelos valores dos componentes principais. Os valores obtidos da análise discriminante possibilitou construir um fenograma que mostrou as distâncias morfométricas entre as espécies. Foram sequenciados os genes CO1, *Cyt b*, 28S e 16S. Por meio de máxima-verossimilhança, foi possível construir filograma de distância genética e os genes estudados apresentaram valores altos de *bootstrap*. A concatenação dos genes CO1, *Cyt b*, 28S e 16S por meio de inferência bayesiana separou as espécies em quatro clados específicos suportados por elevados valores de *bootstrap*. As análises moleculares dos genes por máxima-verossimilhança e combinados na inferência bayesiana mostram que *T. guasayana* e *T. patagonica* divergem das espécies do subcomplexo, as espécies são relativamente próximas a *T. rubrovaria*. *Triatoma sordida* e *T. garciabesi* mantiveram o status de espécies próximas. As populações de *T. sordida*

apresentaram variabilidade, mas com proximidade genética e morfológica. Dadas as dificuldades de identificação específica do subcomplexo *T. sordida*, este trabalho contribuiu para a diagnose específica, bem como para a filogenia dentro da subfamília Triatominae. Conclui-se que os estudos morfológicos, morfométricos e moleculares conduzidos foram úteis para caracterizar as quatro espécies do subcomplexo *T. sordida*, bem como para sugerir um novo posicionamento para *T. guasayana* e *T. patagonica*.

Palavras-chave: Filogenia, Triatominae, subcomplexo *T. sordida*, morfologia, morfometria, molecular.

ABSTRACT

Triatoma garciabesi, *Triatoma guasayana*, *Triatoma patagonica* and *Triatoma sordida* are the subcomplex *T. sordida*, triatomine bugs that can serve *Trypanosoma cruzi* and determine Chagas disease in humans. So because of the epidemiological importance was conducted this study may contribute to the control of these vectors. . So because of the epidemiological importance was conducted this study can contribute to the vector control. The phylogeny of the subcomplex *T. sordida* was conducted by the morphology of the median process pygophore, external female genitalia, histology eggs, morphometry eggs and geometric morphometric wings. Molecular markers were also used CO1, *Cyt b*, 16S, 28S, ITS1 and ITS2. The results corroborate the descriptions of literature and provide new parameters for the characterization of the four species of *T. sordida* subcomplex and the phylogenetic relationships of Triatominae. The study of median process of pygophore of *T. garciabesi*, *T. guasayana* and *T. sordida* by means of SEM showed no differences between the three species. The female external genitalia of *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* and *T. sordida* observed by SEM showed differences that make it possible to distinguish these species. The morphological study of eggs by SEM The morphological study of eggs by SEM enabled possible to describe the characteristics of the exochorion of the four species, but was not very effective for discrimination. The Histological study reveals differences in tissue constitution of the four species exochorion. The morphometric study of eggs show that the variables of length and opercular opening eggs feature significant differences between species, the variable width was not significant. By morphometry of the wings was possible to differentiate the species, the resulting values of centroid size, show differences in the size of the wings and consistent sexual dimorphism. Canonical variables resulted in seven variables, what explained 100% of the difference. The CV1 and CV2 showed greater discriminant power, generating clearly defined groupings. The variability in size and shape of the wings were observed for the values of the principal components. The values obtained from discriminant analysis made it possible to build a phenograms showing morphometric distances between species. The values of the discriminant analysis allowed building a phenogram showing the morphometric distances between species. The sequenced genes CO1, *Cyt b*, 16S and 28S. By maximum likelihood, it was possible to build filograma of genetic distance and the genes studied showed high values of bootstrap. The concatenation of CO1 gene, *Cyt b*, 16S and 28S through Bayesian inference separates species in four specific clades supported by high bootstrap values. The molecular analysis of genes for maximum likelihood and Bayesian inference with combined genes show that *T. guasayana* and *T. patagonica* differ

from subcomplex species; species are relatively close to *T. rubrovaria*. The species *T. sordida* and *T. garciabesi* maintained the status of closely related species, The *T. sordida* feature variability but with genetic proximity. Given the difficulties of specific identification of *T. sordida* subcomplex. This work contributed to specific diagnosis, as well as for the phylogeny within the subfamily Triatominae. It is concluded that the morphological, molecular and morphometric studies were performed, were useful characterize the four species of subcomplex *T. sordida* as to suggest a new positioning for *T. guasayana* and *T. patagonica*.

Keywords: **Keywords:** Phylogeny, Triatomine, *T. sordida* subcomplex, morphology, morphometry, molecular.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem das espécies de Triatominae utilizadas.....	18
Tabela 2. Iniciadores utilizados no estudo.....	32
Tabela 3. Principais características encontradas na vista dorsal, posterior e ventral da genitália externa feminina de espécies do subcomplexo <i>T. sordida</i>	42
Tabela 4. Resultado das mensurações, em mm, do comprimento, largura e perímetro da abertura opércular de ovos de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i>	49
Tabela 5. Resumo da análise de tamanho do centroide pela ANOVA de Procrustes entre machos de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.....	53
Tabela 6. Resumo da análise de tamanho do centroide por ANOVA entre fêmeas de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.....	53
Tabela 7. Resumo da análise de conformação pela ANOVA de Procrustes entre machos de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.....	53
Tabela 8. Resumo da análise de conformação pela ANOVA de Procrustes entre fêmeas de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.....	54
Tabela 9. Resumo das Análises de Variáveis Canônicas entre machos de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). Nota-se que as variáveis CV1 e CV2 explicam maior parte das variações.....	54
Tabela 10. Resumo das Análises de Variáveis Canônicas entre fêmeas de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). Nota-se que as variáveis CV1 e CV2 explicam maior parte das variações.....	55

Tabela 14. Triatomíneos usados no estudo, sequências obtidas dos genes CO1, <i>Cyt b</i> , 28S e 16S, origem, e código de acesso <i>GenBank</i> [®]	65
Tabela 15. Características diferenciais e não diferenciais entre <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i>	72

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Imagem representando os parâmetros mensuradas para os estudos morfométricos das cascas de ovos, espécie <i>T. guasayana</i> . Comprimento, largura e perímetro da abertura opercular dados em milímetros, de acordo Barata (1981), Rosa et al (2000) e Medonça et al (2016).	22
Figura 2. Asas esquerda de <i>T. sordida</i> em lâminas permantes para digitalização das imagens.	23
Figura 3. Vista dorsal da asa esquerda de <i>T. sordida</i> , com a posição dos 9 marcos anatômicos selecionados, marcos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 de tipo 1 e 7 de 2, intersecção entre as veias, de acordo com Monteiro & Reis (1999).....	24
Figura 4. Representação gráfica dos marcos anatômicos e sua disposição em um plano cartesiano. Adaptado Monteiro & Reis (1999).....	25
Figura 5. Representação do alinhamento das configurações individuais pelo Método de Superposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes no programa Clic. As populações hipotéticas estão representadas por cores distintas (rosa, roxo e amarelo).	26
Figura 6. Exemplos de Grades de deformações originadas a partir de uma configuração consenso, adaptado de Moraes (2003).....	28
Figura 7. Processo mediano do pigóforo por MEV. A. <i>T. garciabesi</i> , B. <i>T. guasayana</i> e C. <i>T. sordida</i>	36
Figura 8. Genitalia externa feminina de quatro espécies do subcomplexo <i>T. sordida</i> em vista dorsal. A: <i>T. garciabesi</i> , B: <i>T. guasayana</i> , C: <i>T. patagonica</i> e D: <i>T. sordida</i> . Gc8: gonacoxito 8, Gp8: gonapofise 8, VII e VIII tergitos, IX e X segmento	38
Figure 9. Genitália externa feminina de quatro espécies do subcomplexo <i>T. sordida</i> em vista posterior. A: <i>T. garciabesi</i> , B: <i>T. guasayana</i> , C: <i>T. patagonica</i> e D: <i>T. sordida</i> . Gc8: gonacoxito 8, Gp8: gonapofise 8, VIII tergito, IX e X segmento	39
Figure 10. Genitália feminina externa de quatro espécies do subcomplexo <i>T. sordida</i> em vista ventral. A: <i>T. garciabesi</i> , B: <i>T. guasayana</i> , C: <i>T. patagonica</i> e D: <i>T. sordida</i> . Gc8: gonacoxito 8, Gp8: gonapofise 8, VIII tergito, IX e X segmento.	40
Figura 11. Aspecto geral dos ovos estudados por MEV (50X). A. <i>T. garciabesi</i> , B. <i>T. guasayana</i> , C. <i>T. patagonica</i> e D. <i>T. sordida</i>	44

Figura 12. Detalhe da superfície exocórial por MEV (1000X). A. <i>T. garciabesi</i> , B. <i>T. guasayana</i> , C. <i>T. patagonica</i> e D. <i>T. sordida</i>	45
Figura 13. Imagens dos cortes histológicos das cascas dos ovos (100X). A, <i>T. garciabesi</i> , B. <i>T. guasayana</i> , C. <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i>	47
Figura 14. Variação do tamanho do centroide das asas esquerdas de machos entre populações de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). As caixas mostram os valores médios.	52
Figura 15. Variação do tamanho do centroide das asas esquerdas de fêmeas entre populações de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). As caixas mostram os valores médios.....	52
Figura 16. Diagrama de dispersão em relação à análise de dois fatores de variação de forma alares CV1 e CV2, entre machos. <i>T. garciabesi</i> (elipse verde), <i>T. guasayana</i> (elipse azul escuro), <i>T. patagonica</i> (elipse rosa) e <i>T. sordida</i> Bahia (elipse amarela), <i>T. sordida</i> Goiás (elipse azul claro), <i>T. sordida</i> Minas Gerais (elipse roxo), <i>T. sordida</i> Argentina (elipse vermelho) <i>T. sordida</i> Bolívia (elipse verde claro).....	56
Figura 17. Diagrama de dispersão em relação à análise de dois fatores de variação de forma das asas CV1 e CV2, entre fêmeas. <i>T. garciabesi</i> (elipse verde), <i>T. guasayana</i> (elipse azul escuro), <i>T. patagonica</i> (elipse rosa) e <i>T. sordida</i> Bahia (elipse amarela), <i>T. sordida</i> Goiás (elipse azul claro), <i>T. sordida</i> Minas Gerais (elipse roxo), <i>T. sordida</i> Argentina (elipse vermelho) <i>T. sordida</i> Bolívia (elipse verde claro).....	57
Figura 18. Diagrama de deformação derivado do CV1 resultante da comparação entre as asas de machos (A) e fêmeas (B) de <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> e <i>T. sordida</i> provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). Os vetores indicam as direções das deformações. As elipses representam os eixos que mais diferenciam entre as amostras estudadas.	58
Figura 19. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das asas esquerdas de machos em relação à Análise dos Componentes Principais	60
Figura 20. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das asas esquerdas das fêmeas em relação à Análise dos Componentes Principais.....	61
Figura 21. Fenograma de similaridade morfológica gerado por meio dos valores da distância Mahalanobis obtidas na análise discriminantes.....	62
Figura 22. DNA genômico visualizado em gel de agarose a 1%. M, marcador molecular.1, 2 e 3 <i>T. garciabesi</i> ; 4, 5 e 6 <i>T. guasayana</i> ; 7, 8 e 9 <i>T. sordida</i> Bahia, Brasil; 10, 11 e 12 <i>T.</i>	

sordida Goiás, Brasil; 13, 14 e 15 *T. sordida* Minas Gerais, Brasil; 16, 17 e 18 *T. sordida* Bolívia e 19, 20 e 21 *T. sordida* Argentina.63

Figura 23. Árvore consenso de ML para o gene COI. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.....66

Figura 24. Árvore consenso de ML para o gene *Cyt b*. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.....67

Figura 25. Árvore consenso de ML para o gene 16S. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.....68

Figura 26. Árvore consenso de ML para o gene 28S. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.....69

Figura 27. Filograma consenso da inferência Bayesiana entre os genes COI, *Cyt b*, 16S e 28S concatenados. Clado laranja *T. garciabesi*, *T. guasayana*, clado rosa *T. patagonica* e *T. rubrovaria*, clado azul *T. sordida* Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Pantanal), e *R. brethesi* clado cinza. Modelo de evolução segundo critério Akaike GTR + G.....71

ABREVIATURAS.

µg	micograma
µL	microlitro
µM	micromolar
PrP	processo mediano do pigóforo
gDNA	DNA genômico
mtDNA	DNA mitocondrial
rDNA	DNA ribossomal
Cyt <i>b</i>	Citocromo <i>b</i>
CO1	Citocromo Oxidase I
ITS1	Espaçador interno transcrito 1 (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
ITS2	Espaçador interno transcrito 2 (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
28S	gene ribossomal 28S
16S	gene ribossomal 16S
ML	Microscopia de luz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CTA	Colônia de Triatominae de Araraquara da FCF-UNESP/Araraquara
KOH	Hidróxido de potássio
ANOVA	Análise de variância
CVA	Análises das variáveis canônicas
NaCl	Cloreto de sódio
Tris-HCl	(hidroximetil) aminometano Ácido clorídrico
pH	Potencial hidrogeniônico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
PCR	Reação em cadeia da polimerase
dNTP	Trifosfato de deoxinucleosídeo
dATP	Trifosfato de dioxiadenosina
dGTP	Trifosfato de dioxiguaninosina
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
dCTP	Trifosfato de dioxicitosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.	1
1.1 Doença de Chagas.	1
1.2 Vetores.....	4
1.3 A subfamília Triatominae.....	5
1.4 <i>Triatoma</i> Laporte, 1832.....	5
1.5 Subcomplexo <i>Triatoma sordida</i> (Stal, 1859).	6
1.5.1 Considerações sobre as espécies do subcomplexo <i>T. sordida</i>	6
1.5.2 <i>Triatoma garciabesi</i> Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967.....	6
1.5.3 <i>Triatoma guasayana</i> Wygodzinsky e Abalos, 1949.....	7
1.5.4 <i>Triatoma patagonica</i> Del Ponte (1929).....	9
1.5.5 <i>Tritoma sordida</i> (Stål, 1859).	9
1.6 Sistemática e caracterização específica da subfamília Triatominae.....	10
1.6.1 Estudos morfológicos.	10
1.6.2 Morfometria geométrica.	12
1.7 Sistemática molecular.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Triatomíneos.....	17
3.2 Estudos Morfológicos.....	19
3.2.1 Análises do processo mediano do pigóforo.....	19
3.2.2 Preparo e análise da genitália externa feminina	20
3.2.3 Aspectos morfológicos de ovos.....	20
3.2.4 Estudos histológico de ovos.....	21
3.3 Estudos morfométricos.....	22
3.3.1 Morfometria de ovos.	22

3.3.2 Análises estatísticas.....	23
3.3.3 Morfometria geométrica.....	23
3.3.3.1 Preparo e escolha dos marcos anatômicos.....	23
3.3.3.3 Funções de Flexões de Placas Finas.....	27
3.3.3.4 Tamanhos do Centroide e variações no tamanho.....	28
3.3.3.5 Análises das Variáveis Canônicas.....	29
3.3.3.6 Análise Discriminante.....	29
3.4 Estudos moleculares.....	30
3.4.1 Extrações do DNA genômico.....	30
3.4.2 Amplificações do DNA por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	31
3.4.3 Iniciadores.....	32
3.4.4 Purificações do DNA amplificado.....	33
3.4.5 Sequenciamentos.....	33
3.4.6 Análises filogenéticos.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Estudos morfológicos.....	35
4.1.1 Processo mediano do pigóforo.....	35
4.1.2Morfologia dos ovos.....	43
4.2 Estudos morfométricos.....	48
4.2.1 Morfometria de ovos.....	48
4.3. Morfometria geométrica.....	51
4.3.1 Variabilidades de tamanho das asas entre as espécies.....	51
4.3.2 Variabilidades de forma entre as asas das espécies.....	59
4.3.3 A separação dos grupos é bem definida?	62
4.4. Estudos moleculares.....	63
4.4.1 Extrações do DNA genômico.....	63
4.4.2 Sequenciamentos dos genes.....	64
4.4.3 Gene CO1 mtDNA.....	66

4.4.4 Gene <i>Cyt b</i> mtDNA.	67
4.4.5 Gene 16S rDNA.	68
4.4.6 Gene 28S rDNA.	69
4.4.7 Inferência Bayesiana.	70
4.5 Resultados dos estudos filogenéticos.	72
5. DISCUSSÃO.	73
6. CONCLUSÕES.	79
REFERÊNCIAS	80
Carta de submissão artigo.	96

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Doença de Chagas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) categoriza a doença de Chagas como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas, assim como, dengue, malária e leishmaniose. As doenças negligenciadas fazem parte de um grupo de infecções causadas por uma variedade de patógenos (como vírus, bactérias ou protozoários). Segundo a OMS, as doenças tropicais afetam atualmente 1 bilhão de pessoas em 149 países (WHO, 2015b). Particularmente, essas enfermidades restringem-se, principalmente, a regiões socialmente desfavorecidas, produzindo desse modo sérios danos sociais e econômicos, bem como, índices elevados de mortalidade, incapacidade física, alto custo clínico, entre outros (DIAS & SCHOFIELD, 1998; DIAS, 2006).

A primeira associação entre o agente etiológico, vetor e reservatório foi por meio das investigações do médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em trabalho publicado no ano de 1909 (CHAGAS, 1909; WHO, 2015). Chagas não apenas descreveu o protozoário *T. cruzi*, como desvendou toda a cadeia epidemiológica da doença. Historicamente o protozoário possui um ciclo exclusivamente silvestre, formado pelos reservatórios naturais e os triatomíneos, essa complexa relação ecológica passou por várias mudanças que estão relacionados ao surgimento de uma nova dinâmica epidemiológica, hoje a doença é um problema de saúde pública que ultrapassa as barreiras continentais americanas, assumindo a triste condição de ser uma das principais endemias da região, bem como uma enfermidade globalizada. (FORATTINI, 1980; DIAS, 2006; GALVÃO, 2014; WHO, 2015a). A melhoria das condições definidas como básicas, como acesso a programas de saúde, ampliação de programas habitacionais, intensificação do controle vetorial e dos hospedeiros intermediários, são medidas essenciais para o controle (SCHOFIELD et al, 2006; WHO, 2015A).

Em regiões consideradas não endêmicas para a doença, como Estados Unidos, países europeus e asiáticos, como o Japão, existem um grande número de pessoas infectadas com *T. cruzi*, imigrantes de regiões endêmicas ou infectadas por outras vias não vetoriais. (DIAS & SCHOFIELD, 1998; SCHUMUNIS, 2007; GASCON et al, 2010; IMAI et al, 2015;). Segundo, Imai *et al* (2015) o Japão possui aproximadamente 300,000 imigrantes latinos, onde até o ano de 2007 foram reportados 4.500 casos de doença de Chagas em sua forma crônica.

Na Espanha, país que recebe muitos imigrantes de países latinos, como Argentina, Bolívia, Equador, Colômbia, estima-se que aproximadamente 48.000 imigrantes estão infectados com *T. cruzi* (GASCON et al, 2010; DIAS, 2013).

Vias secundárias de transmissão que não estão relacionadas ao contato com fezes ou urina dos insetos vetores, são as principais causas de novos casos de infecção por *T. cruzi* em regiões não-endêmicas para o vetor. As vias secundárias mais comuns são: sangue contaminado, via congênita ou vertical, acidentes laboratoriais, manuseio de animais contaminados e oral. A principal via de transmissão da infecção chagásica é a vetorial responsável por 80% dos casos, seguida pela contaminação transfusional, que atualmente é a segunda principal via de transmissão da infecção chagásica (DIAS & SCHOFIELD, 1998; CATALÁ et al, 2004; GALVÃO, 2014; DIAS, 2015).

A transmissão congênita ou vertical por *T. cruzi* possui importância em regiões endêmicas e não-endêmicas, onde podemos encontrar mulheres em idade reprodutiva (IMAI et al, 2015). Países sul americanos como Brasil, Uruguai, Chile e Argentina diminuíram a infecção vetorial, assim a vigilância sobre outras vias infecciosas merecem atenção, estima-se que atualmente na Argentina e no Brasil uns dos principais meios de contaminação é e pela via congênita. Em países não endêmicos como Japão e Espanha a transmissão congênita é um problema de saúde pública, principalmente pela presença de imigrantes em idade fértil, podendo chegar a 60% do total na Espanha (GASCON et al, 2010).

O acompanhamento de gestantes é ineficiente, fato que influencia diretamente nas ações de controle, a transmissão por vertical está longe de ser satisfatório, principalmente em regiões pobres dependentes de políticas públicas voltadas para o diagnóstico e tratamento da infecção (MORETTI et al, 2005; ALONSO-VEGA et al, 2013; WHO, 2015a).

Embora, se perceba um decréscimo na transmissão vetorial em regiões endêmicas atualmente há relatos de surtos da infecção por *T. cruzi* por ingestão de alimentos contaminados no Brasil, Venezuela e Colômbia (DIAS et al, 2002; PEREIRA et al, 2009; FERREIRA et al, 2014; SOTO et al, 2014; NOYA et al, 2015;). A infecção ocorre de forma esporádica, mas suas consequências são severas, podendo resultar em um quadro agudo da doença (CAVALCANTI et al, 2009; PEREIRA et al, 2009; DIAS, 2015).

A infecção por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com formas infectantes de *T. cruzi*. Segundo Dias (2015) a ingestão é muito comum no ciclo silvestre do protozoário, maximizada pelo consumo de carne contaminada de animais silvestres, roedores, primatas entre outros, o autor cita outros alimentos associados a infecção por via oral, como poupa de frutas e sucos, que possivelmente não passaram por processos de esterilização. Em regiões que há relatos de surtos da infecções por via oral, busca-se a implementação de medidas de controle sanitário, principalmente sobre os tipos de alimentos associados a infecções anteriores (PEREIRA et al, 2009; SILVEIRA, 2011; ANEZ et al, 2013; SOTO et al, 2014).

Nas últimas décadas, ocorreram avanços consideráveis no controle da doença, decorrentes do desenvolvimento sócio-econômico e de decisões políticas relacionados principalmente ao controle e prevenção de novos casos. A gestão deste quadro, depende da permanência dos programas e da cooperação entre órgãos governamentais, universidades, programas de saúde, agências de pesquisas e da comunidade (SCHOFIELD et al, 2006; ANDRADE et al, 2014; COURA et al, 2014; GALVÃO, 2014;).

Os avanços na vigilância epidemiológica, decorrem da implementação de programas internacionais e regionais; como a iniciativa de países do Cone Sul. Iniciada nos primeiros anos da década de 1990, a iniciativa foi importante por envolver órgãos internacionais e agências regionais, que foram responsáveis por mudanças significativas relacionadas ao controle vetorial, diagnóstico e nas atividades hemoterápicas (DIAS, 1998, 2006; GALVÃO, 2014).

No Brasil o controle químico obteve resultados satisfatórios, como por exemplo, na eliminação de focos de infestações de triatomíneos, especialmente de *T. infestans* em várias regiões do país. O uso de inseticidas sintéticos é eficaz para o controle de triatomíneos no domicílio humano. (DIAS et al, 2002; SCHOFIELD et al, 2006). Em alguns países as medidas de controle e prevenção ainda são insuficientes, principalmente pela escassez de políticas públicas e investimento em pesquisas (SCHOFIELD et al, 2006; DIAS, 2007, 2013).

O cenário atual da doença de Chagas, é estável, mas a manutenção da vigilância é de extrema importância para continuidade dos trabalhos realizados nas últimas décadas. Apesar dos relatos da doença fora de regiões endêmicas serem relativamente recentes, deve-se atentar para o intenso tráfego de pessoas pelo mundo, bem como seus patógenos. Enfemidades antes

confinadas em regiões menos favorecidas, hoje posicionam-se como um problema de saúde pública global; como percebido na epidemia do vírus Ebola na África Ocidental, iniciada no final de 2013. O surto foi responsável por uma nova visão em relação a veiculação de patógenos, principalmente em um momento de intenso fluxo de pessoas, conduzido a novas discussões sobre a situação atual das medidas de controle globais de doenças infecciosas (DIAS & SCHOFIELD, 1998; DIAS et al, 2002; DIAS, 2006; SCHOFIELD et al, 2006; GALVÃO, 2014; TARLETON et al, 2014; HEYMANN et al, 2015).

1.2 Vetores.

Os vetores do protozoário *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas são os triatomíneos. Os triatomíneos são hemípteros que possuem como principal característica a hematofagia, comportamento que resulta na contaminação dos insetos pelos tripanossomatídeos circulantes na corrente sanguínea de animais infectados. Os triatomíneos distribuem-se por toda região Neotropical onde representa um problema de saúde pública. Potencialmente, todos os triatomíneos são vetores para *T. cruzi*, mas os gêneros importantes pelo aspecto epidemiológico são: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 1998; CERETTI et al, 2008; SCHOLFIELD & GALVÃO, 2009).

Os triatomíneos vivem próximos a sua fonte alimentar, abrigando-se em ecótopos habitados por animais como marsupiais, roedores, aves, lagartos, entre outros. As espécies da subfamília são naturalmente silvestres, mas algumas são sinantrópicas, ou seja, possuem alguma relação com o homem, *T. infestans* e *T. sordida* corriqueiramente são relatadas juntas ou próximos a moradia humana, essas espécies podem serem consideradas sinantrópicas, *T. sordida* atualmente é a espécie mais reportada no peridomicílio na região centro-oeste do Brasil (LENT & WYGODZINSKY, 1979; FORATTINI, 1980; GALVÃO, 2014).

As condições de domiciliação desses vetores estão relacionadas a vários fatores que ainda não são totalmente compreendidos, possivelmente condicionados pela biologia e pelas condições oferecidas pelas habitações humanas; costumeiramente casas simples, construídas em áreas rurais, sem condições sanitárias. Desta forma, temos microambientes ideais para adaptação vetorial, que suprem todas necessidades para o desenvolvimento do inseto hematófago, que normalmente se alojam em frestas de paredes, atrás de camas, em móveis,

baús ou em áreas externas das moradias como habitáculos de animais domésticos (FORATTINI, 1980; DIOTAIUTI, 2000).

Os triatomíneos possuem uma grande plasticidade adaptativa, fator interessante, já que a capacidade de domiciliação das espécies está ligada ao ciclo doméstico da infecção. A interferência humana no habitat dos triatomíneos é um dos fatores determinantes no aparecimento de novas infestações, as degradações dos ecossistemas geram novos padrões de distribuição, e dispersão desses vetores; outro fator considerável são as mudanças da temperatura média global, supostamente relacionadas a atividades industriais iniciadas no século XVIII. Estudos recentes mostram que as alterações ambientais causadas pelo o homem, afeta a saúde humana em vários aspectos, sociais e econômicos, tal como qualidade de vida e acesso a saúde (COSTA et al, 2014; DIRZO et al, 2014).

1.3 A subfamília Triatominae

A subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) conta com 152 espécies, duas fósseis, *T. dominicana* (POINAR, 2005) e *P. hispaniolae* (POINAR, 2013). No Brasil, são reportadas 67 espécies (GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al, 2016; SOUZA et al, 2016).

A classificação sistematizada da subfamília Triatominae, resulta principalmente da revisão de Lent & Wygodzinsky (1979) a mesma constantemente revisada por outros autores. Os triatomíneos possuem características que os diferenciam de outros hemipteros, como sua morfologia e seu hábito alimentar. Esses insetos possuem o aparelho bucal adaptado a sucção de sangue, característica que diferencia a subfamília de outros reduvidos que são predadores (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 2014).

A importância da subfamília resulta, dentre outros fatores, de sua condição vetorial, pois todas as espécies em seus cinco estádios ninfais, assim como fêmeas e machos podem abrigar o *T. cruzi* (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 2014).

1.4 *Triatoma* Laporte, 1832

O gênero *Triatoma* conta com 75 espécies divididas em oito complexos e oito subcomplexos, e representa a maior diversidade dentro da subfamília Triatominae. (GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al, 2016)

Os representantes do gênero *Triatoma* possuem importância epidemiológica, ou seja, podem veicular *T. cruzi*. No Brasil, algumas espécies são relevantes pela sua capacidade vetorial, como, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata* (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 2014).

1.5 Subcomplexo *Triatoma sordida* (Stal, 1859).

O subcomplexo *Triatoma sordida* compreende: *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*. Os representantes naturalmente silvestres podem ser encontrados junto a moradia humana, portanto, são rotineiramente associados a transmissão de *T. cruzi* ao homem (WYGODZINSKY & ABALOS, 1951; CARCAVALLO et al, 1967; LENT & WYGODZINSKY, 1979; FORATTINI, 1980; CANALE et al, 2000; WISNIVESKY-COLLI, 2003; CAVALLLO et al, 2016).

As espécies do subcomplexo *T. sordida* apresentam similaridades morfológicas, morfométrias e comportamentais que dificultam a identificação específica (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GORLA et al, 1993; PANZERA et al, 1997). Segundo Panzera et al (2015) as discussões a respeito das relações evolutivas do subcomplexo são controversas e permanecem em discussão.

1.5.1 Considerações sobre as espécies do subcomplexo *T. sordida*.

1.5.2 *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967.

A espécie distribui-se pela região semi-árida da Argentina (Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Córdoba, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Santa Fé) e pelo Chaco boliviano, ecossistema que se estende pela Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil (Gran Chaco) característico por possuir planície de floresta e selvas (LENT & WYGODZINSKY, 1979, SCHOLFIED & GALVÃO, 2009).

Triatoma garciabesi possui similaridade morfológica com *T. sordida*, percebidas na dimensão corpórea e nos padrões cromáticos, a espécie apresenta coloração mais escura quando comparada com *T. sordida*. Destacam-se também diferenças em outros parâmetros morfológicos como por exemplo, cabeça, no tamanho e forma do pronoto e escutelo e nas

peças genitais (LENT & WYGODZINSKY, 1979; JUBERG et al, 1998; GALVÃO et al, 2003b; GURGEL et al, 2011).

As similaridades entre *T. garciabesi* e *T. sordida* são discutidas em vários trabalhos. Actis et al (1965) ao comparar o padrão eletroforético de *T. sordida* provenientes da Argentina e dados publicados de populações do Brasil, percebe diferenças que só se explicam em espécies distintas. Carcavallo et al (1967) descreveram diferenças entre *T. garciabesi* e *T. sordida*, fundamentado-se principalmente em diferenças morfológicas da cabeça e estruturas fálicas. Em 1979, em revisão da subfamília Triatominae Lent & Wygodzinsky sinominizam as espécies, considerando inconclusivas as diferenças apresentadas em publicações anteriores, desconsiderando *T. garciabesi* como espécie válida.

Panzer et al. (1997) em estudos de citogenética de populações de *T. sordida* provenientes da Argentina e Brasil, descrevem diferenças na quantidade de heterocromatina destas populações, e propõem duas hipóteses para explicar tais diferenças, a primeira sugerindo que as populações de ambas regiões são geneticamente diferentes e a segunda supõem a existência de duas espécies distintas, deixando em aberto a discussão. Jurberg et al. (1998) revalidaram *T. garciabesi*, considerando a baixa similaridade genética com *T. sordida* somada a diferenças morfológicas.

A espécie merece atenção na vigilância entomológica, Segundo Canale et al (2000) *T. garciabesi* é abundante no peridomicílio humano (Província de Santiago del Estero, Argentina) com capacidade de infestar regiões antes colonizadas por *T. infestans* ou *T. sordida*, os autores não relatam a invasão domiciliar.

1.5.3 *Triatoma quasayana* Wygodzinsky e Abalos, 1949.

Triatomíneo encontrado na Argentina (Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Chaco, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fé, Santiago Del Estero, Tucumán), Bolívia (Santa Cruz, Tarija, La Paz), Paraguai (Alto Paraguay, Boquerón, Nueva Asunción, Paraguai (Presidente Hayes).

Os machos apresentam em média 16.0 - 18.5 mm, as fêmeas relativamente maiores, com média de 18.0 - 20.5 mm, a coloração vai do marrom escuro ao preto, possui manchas amareladas na região do pescoço (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Em ecótopos silvestres *T. quasayana* é encontrando habitando troncos, bromélias e cactáceas, geralmente

alimentando-se de marsupiais, aves, répteis e roedores (WYGODZINSKY & ABALOS, 1949; LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Gorla *et al.* (1993), apontando para similaridades entre as espécies, discutem sobre a relação de “parentesco” morfológico, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento, o mesmo pontuado por Abalos & Wygodzinsky (1951). A diferenciação morfológica entre *T. guasayana* e *T. sordida* é complexa, pois geralmente a diferenciação baseia-se quanto na coloração do conexivo e no tamanho do segundo segmento do rostro, maior em *T. sordida* (USINGER *et al.*, 1966; LENT & WYGODZINSKY, 1979; FORATTINI, 1980; ARGUELLO *et al.*, 1983; REBAGLIATI *et al.*, 1998; GALVÃO *et al.*, 2003; LOZA-MURGUIA & NOIERAU, 2010).

Outros parâmetros de diferenciação foram utilizados para melhor caracterizar esses triatomíneos. Rebagliati *et al.* (1998), estudaram o comportamento meiótico de populações de *T. guasayana* e *T. sordida* ambos da Argentina e de híbridos de *T. sordida* (Argentina x Brasil) os estudos indicaram semelhanças no processo meiótico entre *T. guasayana* e *T. sordida*, mas com diferenças cariotípicas, bem como diferenças na área total dos cromossomos e na área relativa dos cromossomos sexuais. Panzera *et al.* (1997, 2015) demonstraram diferenças entre populações de *T. guasayana* e *T. sordida*, fundamentando seus resultados em estudos do cariótipo e padrão isoenzimático.

Recentemente, alguns autores sugerem uma organização nova para os subcomplexos da subfamília Triatominae, o mesmo para o subcomplexo *T. sordida*, *T. guasayana* vem apresentando em alguns trabalhos uma maior proximidade genética com espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* (GARDIM *et al.*, 2013, PANZERA, *et al.*, 2015; PITA *et al.*, 2016)

Espécie naturalmente silvestre, normalmente não é encontrada junto às moradias humanas, principalmente as formas imaturas que geralmente possuem comportamento passivo, portanto, dificilmente são encontradas no domicílio, comportamento associados aos espécimes adultos, que podem serem atraídos pela luz (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GORLA *et al.*, 1993; NOIERAU & DUJARDIN, 2010). Segundo Canale *et al.* (2010) a espécie é frequentemente capturada na região peridomiciliar na Provincia de Santiago del Estero, Argentina onde associa-se a veiculação de *T. cruzi* à animais domésticos, portanto, merecendo atenção na vigilância epidemiológica.

1.5.4 *Triatoma patagonica* Del Ponte (1929)

Espécie distribuída pela região mais austral das Américas: Argentina (Tinogasta, Catamarca, Tres Portenãs, Mendoza, Sierra de la Ventana, Buenos Aires, Chanicó, La Pampa, Rio Colorado, Gral Frias, Rio Negro, Los Mártires, Gaiman e Chubut) e Uruguai (WYGODZINSKY & ABALOS, 1951; LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO et al, 2003; WISNIVESKY-COLLI, 2003)

O tamanho corpóreo varia de 17 a 18,5 mm entre os machos, 18 a 21 mm entre as fêmeas. A espécie está relacionada à transmissão de *T. cruzi* (WISNIVESKY-COLLI, 2003), naturalmente encontrada em ambientes silvestres podem colonizar o peridomicílio, veiculando *T. cruzi* a animais domésticos, habitações humanas criam condições ideais para possíveis domiciliações desse triatomíneo, Gorla *et al* (1993), relatam que em algumas localidades da Argentina a espécie pode infestar habitats antes colonizados por *T. infestans*, merecendo atenção da vigilância epidemiológica.

1.5.5 *Tritoma sordida* (Stål, 1859).

Espécie amplamente distribuída pelo território brasileiro, sendo um dos principais vetores por estarem associados a veiculação de *T. cruzi* a animais domésticos e frequentemente infectados, Segundo Ribeiro *et al* (2014) nos municípios de Macaúbas e Santo Inácio (Bahia, Brasil) os índices de infecção foram 6.1% e 34% respectivamente. A espécie distribui-se por vários estados brasileiros: Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo. Encontrada também na Argentina (Misiones, Corrientes, Santa Fé, Leste de Formosa e no Chaco), Paraguai (Concepción, Cordillera, Central, Nueva Asunción), Bolívia (Cochabamba, La Paz, Santa Cruz, Beni, Tarija) e Uruguai (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO et al, 2003b).

O macho da espécie possui comprimento médio de 14 a 19 mm, as fêmeas normalmente maiores de 15 a 20 mm (LENT & WYGODZINSKY, 1979) do ponto de vista cromático a espécie possui coloração clara, raramente escura, com algumas regiões do corpo amarelada (GALVÃO, 2014). Espécie frequentemente encontrada infectada com *T. cruzi* frequentemente relatada no peridomicilio substituindo infestações controladas de *T. infestans*

(GORLA et al, 1993; RIBEIRO et al, 2014). *T. sordida* possui comportamento sinantrópico, adaptando-se com facilidade no peridomicílio, nesse ecótopo o inseto abriga-se em galinheiros chiqueiros ou por entulhos distribuídos ao redor das moradias (LENT & WYGODZINSKY, 1979; FORATTINI, 1980; JURBERG et al, 2004; OBARA et al, 2011).

Forattini (1980) discute o sinantropismo de *T. sordida*, destacando a facilidade em colonizar o peridomicílio, onde a mesma se alimenta de animais domésticos, o autor relata que a ação antropica é o principal precursor da dispersão desses vetores, essa espécie possivelmente apresenta como centro de endemismo a região central do Brasil. Segundo Rossi *et al* (2015) as características das habitações humanas influenciam na domiciliação desse triatomíneo, o estudo mostra como a presença de galinheiros e sua estrutura, proporcionam condições ideais para o desenvolvimento.

Estudos com populações de *T. sordida* revelam diversidade comportamental, genética e morfológica (FORATTINI, 1980; GONZALEZ-BRITEZ et al, 2014; PANZERA et al, 2015; ROSSI et al, 2015). Panzera et al (2015) sugere que possivelmente pode haver pelo menos uma espécie nova na Argentina, hoje, descrita com *T. sordida*.

1.6 Sistemática e caracterização específica da subfamília Triatominae.

1.6.1 Estudos morfológicos.

Os triatomíneos, bem como a maioria dos insetos, foram primeiramente caracterizados por estudos morfológicos, desta maneira, por meio de análises comparativos de várias estruturas foi possível classificar sistematicamente estes artrópodes, agrupando espécies que possuem características semelhantes e da mesma forma separando outras com características distintas (GALVÃO, 2014). Os primeiros estudos taxonômicos da subfamília Triatominae, foram por meio de análises de estruturas anatômicas, diferenças cromáticas e estudos de ovos entre outros (LENT & JURBERG, 1965, 1967; LENT & WYGODZINSKY, 1979; BARATA, 1981; DUJARDIN et al, 1999; ROSA et al, 2014).

Os estudos tradicionais do fenótipo são realizados por meio de microscopia de luz. A princípio a microscopia de luz, é uma metodologia muito importante para os estudos com caracteres morfológicos e morfométricos de triatomíneos contribuindo para a compreensão das relações taxonômicas da subfamília, mas devido a necessidade de implementar às técnicas de estudo, houve a necessidade de implementar novas ferramentas, que, pudessem oferecer

novas possibilidades para os estudos. Uma das técnicas que vieram revolucionar a taxonomia em triatomíneos foi a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Segundo Galvão (2014), as primeiras utilizações da MEV, refere-se a Barth & Muth (1958), com estudos de ovos; logo Carcavallo *et al.* (1978), utilizaram a MEV para descrição de estádios imaturos de *Alberprosenia goyovargasi*. Lent & Wygodzinsky (1979) aplicaram a técnica em estudos de várias estruturas anatômicas, publicando um dos estudos mais completos sobre os Triatominae.

Para os estudos de ovos, Barata (1981) também utilizou a técnica de MEV, caracterizando alguns gêneros. Os estudos da arquitetura dos ovos são importantes para a distinção entre as espécies. Obara *et al* (2007) realizaram estudos comparativos com ovos de quatro espécies do gênero *Meccus*, por meio de microscopia de luz, MEV e cortes histológicos.

Outro parâmetro importante para o estudo taxonômico da subfamília Triatominae são as estruturas fálicas, composta por várias peças que apresentam características inerentes a espécie possibilitando distinção tanto entre táxons próximos bem como entre gêneros. Lent & Jurberg (1965) validam a genitália masculina como caractere discriminatório para espécies da subfamília Triatominae. A genitália masculina externa está localizada entre o 8º e 9º segmentos abdominais, entre as várias peças que compreendem a região fálica o 9º segmento ventral ou Pigóforo apresenta-se como uma estrutura importante para o estudo taxonômico, o processo mediano do pigóforo (PrP), possui arquitetura bem característica e sua especificidade é explorada em estudos comparativos (LENT & JURBERG, 1967; LENT & WYGODZINKY, 1969; JURBERG *et al*, 2005, 2013;).

A morfologia da genitália feminina apresenta características que auxiliam no estudo taxonômico e na compreensão sistemática da subfamília Triatominae (ROSA *et al*, 2010, 2014). A genitália feminina se estende pelos segmentos finais do abdômen. Lent & Jurberg (1969) citam duas regiões interessantes para os estudos comparativos, gonocoxitos e gonapofíses, estruturas que apresentam certo grau de polimorfismo entre as espécies, possibilitando a diagnose específica, como proposto por Rosa *et al* (2010) que estudaram as faces dorsais, laterais, posteriores e ventrais por MEV de seis espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Em 2012, Rosa e colaboradores, confirmaram a validade taxonômica desse carácter ao mostrarem as diferenças entre 14 espécies de *Rhodnius*.

1.6.2 Morfometria geométrica.

A morfometria compreende o estudo da variação de forma em relação ao tamanho de regiões anatômicas homólogas e como suas variáveis se relacionam (MORAES, 2003; ROHLF et al, 1993). Do ponto de vista evolutivo forma e tamanho refletem a função da estrutura, assim a morfometria fornece subsídios para elucidar relações taxonômicas, populacionais, evolutivas ou de fenômenos específicos como especiação ou relações entre espécies crípticas (; MORAES, 2003, FORNEL, 2005).

A partir do início do ano 1990 uma nova abordagem morfométrica surgiu procurando implementar técnicas utilizadas anteriormente, a nova ferramenta possibilita avaliar as estruturas anatômicas de forma abrangente quando comparada com metodologias tradicionais, (ROHLF et al, 1993; MORAES, 2003). A morfometria geométrica avalia as variações de forma e tamanho por meio de técnicas multivariadas que dentre outros fatores possibilita a visualização gráfica dos dados obtidos, a técnica é avaliada simultaneamente vários níveis de variação e covariação entre as mensurações (MORAES, 2003). Em termos gerais a utilização de técnicas multivariadas para o estudo taxonômico só foi possível a partir do aumento da capacidade computacional bem como o acesso a programas. (MORAES, 2003; GURGEL, 2008).

A realização da técnica e a qualidade dos resultados dependem de vários fatores que envolvem um estudo inicial a estrutura a ser analisada e subsequentemente a determinação dos marcos anatômicos ou pontos de referências, que são escolhidos a partir de estruturas homólogas. Os marcos anatômicos são pontos referenciais que quando traçados destinam-se a corresponder de forma completa a estrutura investigada oferecendo informações sobre a conformação geométrica, em triatomíneos como exemplo, normalmente são analisados asas, cabeças, ovos e ninfas (; MONTEIRO & REIS, 1999; DUJARDIN et al, 2007; GURGEL, 2008; GALVÃO, 2014).

Dujardin *et al* (2014) citam que as características como rigidez e simetria são atributos essenciais para estudo da morfometria geométrica como, por exemplo, asas de alguns artrópodes, tais atributos facilitam a escolha e a coleta dos pontos referenciais. As asas são adequadas para este tipo de estudo por apresentarem características ideais como bidimensionalidade e a ampla quantidade de marcos anatômicos (BOOKSTEIN, 1991). Vários trabalhos utilizam as asas para investigar relações taxonômicas e sistemáticas

(JARAMILLO et al, 2002; VILLEGAS et al, 2002; GURGEL et al, 2011; MÁRQUEZ et al, 2011).

Segundo Bookstein (1991), a utilização de marcos anatômicos é uma maneira eficaz de estudar as formas dos organismos e suas variações entre diferentes indivíduos. Os marcos distribuídos em um plano geométrico originam um sistema referencial ou sistema de coordenadas cartesianas, que permitem a observação tridimensional da região anatômica de maneira aproximada a forma real do organismo.

Para o estudo baseado em marcos anatômicos, um dos primeiros passos é eliminar o fator tamanho da estrutura estudada de cada indivíduo, ou seja, padronizar uma medida geral que representa o consenso de todas as medidas individuais, dessa maneira é possível focar nas diferenças inerentes a cada população (MONTEIRO & REIS, 1999; MORAES, 2003). Segundo, Moraes, (2003) a padronização do fator tamanho é resultante de uma medida multivariada de tamanho, denominada Tamanho do Centróide.

O Tamanho do Centróide é calculado para cada espécime e os mesmos são igualados, facilitando a comparação da região estudada. O centróide é calculado a partir da raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada ponto de referência e o centro de massa ou centróide (VILLAGAS et al, 2002; MORAES, 2003; DUJARDIN et al, 2007).

O estudo dos triatomíneos por meio de morfometria geométrica é relativamente novo e vem sendo aplicado como complemento de estudos taxonômicos, principalmente por preservar o arranjo espacial da estrutura estudada, reduzindo as diferenças de crescimento normalmente relacionadas a fatores ambientais (VILLEGAS et al, 2002; GURMIEL et al, 2003; SCHACHTER-BROIDE, 2004; DUJARDIN et al, 2007; GURGEL, 2008; MÁRQUEZ et al, 2011).

Em resumo a morfometria geométrica objetiva detectar e descrever padrões estatísticos multivariados, ou seja, com mais de duas variáveis, e sua eficácia está relacionada à escolha da região anatômica analisada e às variáveis que serão utilizadas para representar padrões espaciais e estruturais (BOOKSTEIN, 1991; MONTEIRO & REIS, 1999; MORAES, 2003).

1.7 Sistemática molecular.

A relações filogenéticas entre as espécies de triatomíneos estão sendo compreendidas, e todo entendimento é sustentado por várias abordagens, primeiramente a identificação desses vetores esteve fundamentada em padrões morfológicos, morfométricos e biológicos, mas considerando a enorme diversidade da subfamília, essas podem gerar inconclusões a respeito das relações filogenéticas (LENT & WYGODZINSKY, 1979; DUJARDIN et al, 1999; ROSA et al, 2003, 2005).

Os estudos fundamentados em biologia molecular oferecem novas perspectivas a respeito das relações sistemáticas, assim justifica-se a sua aplicação ao estudo epidemiológico. De acordo com Galvão (2014) a técnica pode influenciar positivamente no controle vetorial bem como na vigilância, reflexo da identificação precisa. A diagnose específica é essencial como metodo para o desenvolvimento de estratégias de controle vetorial (LENT & WYGODZINSKY, 1979; ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2005).

Os estudos filogenéticos utilizam marcadores moleculares para avaliar a variabilidade genética (CARCAVALLO et al, 2000; ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2005; CERETTI et al, 2008; GARDIM et al, 2014). Os genes mitocondriais Citocromo Oxidase I (CO1) e Citocromo B (Cyt *b*) fazem parte de um grupo de marcadores genéticos utilizados nos estudos filogenéticos de diversos organismos (HILL, 1987). O DNA mitocondrial (DNAm) possui um código genético exclusivo, ligado a herança materna. Estudos moleculares baseados em segmentos DNAm possibilitam uma melhor compreensão de relações filogenéticas (FOLMER et al, 1994; GARDIM et al, 2014) O DNAm não passa por eventos de recombinação, apresentando uma taxa de mutação relativamente maior que o DNA nuclear (HILLS, 1987; MONTEIRO et al, 2003; ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2005).

O DNA nuclear (DNAn) apresenta regiões utilizadas nos estudos filogenéticos com triatomíneos (GALVÃO, 2014). A região gênica nuclear não codificante, Espaçador Interno Transcrito (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacer*), como exemplo, é amplamente utilizada em estudos de relações filogenéticas de linhagens evolutivamente recentes, assim o sequenciamento de regiões gênicas variáveis assumem importância no estudo de relações com espécies crípticas (HILL & DIXON, 1991; BARGUES et al, 2002).

No DNA ribossomal os fragmentos ITS1 e ITS2 localizados entre as regiões 18S e 28S são altamente conservadas possuem uma grande número de cópias (BARGUES & MASCOMAS, 1997; MARCILLA et al, 2002). Os fragmentos do DNA nuclear, ITS1 e ITS2 normalmente são utilizados para estudos de relações filogenéticas entre gêneros ou em relações intra e interespecíficas (HILLS, 1991; BARGUES et al, 1997; GALDINO, 2010).

2. OBJETIVOS

Determinar o grau de discriminação entre *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*, integrantes do subcomplexo *T. sordida* por meio de abordagens morfológicas, morfométricas e moleculares.

2.1 Objetivos específicos

- Descrever o processo mediano do pigóforo de *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T. sordida*, por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Descrever a genitália feminina externa de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Estudar os ovos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar por meio de estudo morfométrico os ovos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*;
- Fazer estudo histológico de ovos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*;
- Avaliar as variações biométricas das asas de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* por meio da morfometria geométrica;
- Estudar a variabilidade genética de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*, por meio dos marcadores CO1, Cyt b, 16S, 28S.
- Correlacionar os estudos morfológicos, morfométricos e moleculares, inferindo a respeito das relações evolutivas do subcomplexo *T. sordida*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Triatomíneos.

Os espécimes utilizados foram mantidos no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual Paulista - Campus de Araraquara (FCF-UNESP/Araraquara), identificadas com código CTA (Colônia de Triatominae de Araraquara) *T. garciabesi* e *T. guasayana* foram doados pelo Prof. Dr. Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. *Triatoma patagonica* foram provenientes da coleção “Zoología Invertebrados” do Museu de La Plata (FCNyM-UNLP) e do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Os dados estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Origem das espécies de Triatominae utilizadas.

Espécie	CTA	Origem	Início
<i>Triatoma garciabesi</i>	CTA 240	Rivadavia, Província de Salta, Argentina	2003
<i>Triatoma guasayana</i>	CTA 215	Província de Tita, Bolívia	2003
<i>Triatoma patagonica</i>	--	“Zoología Invertebrados” do Museu de La Plata (FCNyM-UNLP)	--
<i>Triatoma patagonica</i>	--	Lab. Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, IOC – FIOCRUZ	--
<i>Triatoma sordida</i>	CTA 262	Seabra, Estado da Bahia, Brasil	2014
<i>Triatoma sordida</i>	--	Monte Azul, Estado de Minas Gerais, Brasil	2016
<i>Triatoma sordida</i>	--	Catuti, Estado de Minas Gerais	2015
<i>Triatoma sordida</i>	CTA 191	Posse, Estado De Goiás, Brasil	
<i>Triatoma sordida</i>	--	Apolo, Departamento de Santa Cruz, Bolívia	--
<i>Triatoma sordida</i>	--	Cordillera, Departamemto de Santa Cruz, Bolívia	--
<i>Triatoma sordida</i>	--	San Miguel, Província Corrientes, Argentina	--

CTA (Colônia de Triatominae de Araraquara da FCF-UNESP/Araraquara)

3.2 Estudos Morfológicos.

3.2.1 Análises do processo mediano do pigóforo.

Para a descrição do processo mediano do pigóforo (PrP) por MEV, foram observadas amostras de *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T.sordida*. Avaliou-se populações de várias localidades para verificar possíveis polimorfismos presentes em *T. sordida*, *T. patagonica* não foi estudada por este parâmetro por ausência de amostras.

Selecionou 10 amostras de cada população, que foram preparadas como descrito abaixo:

Seccionou a genitália masculina do corpo do inseto, posteriormente imersas em solução KOH 20% (Hidróxido de potássio), onde foram aquecidas até fervura para o amolecimento do tecido quitinoso e clarificação.

Após o processo de amolecimento e clarificação da peça, com auxílio de lupa estereoscópica LEICA®MZ APO, o processo mediano do pigóforo foi seccionado do pigóforo. A limpeza foi realizada por série alcoólica (3 min – em álcool a 60%, 3 min – em álcool a 70%, 3 min – em álcool a 80%, 3 min – em álcool a 90%, 3 min – em álcool a 100%, 2 min – em acetona) com auxílio de cuba lavadora ultra-sônica Ultracleaner 1650 – UNIQUE, e secos em estufa a 40° como descrito a seguir:

Para o exame por MEV, as peças foram aderidas por meio de esmalte para unhas incolor, em toros de alumínio medindo 10 mm de diâmetro por 5 mm de altura, para metalização com ouro, empregou-se pulverização por 80 segundos a 10 mA, como descrito em Rosa *et al* (2014).

As amostras foram fotografadas e observadas com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura - Topcon SM-300 - Instituto de Química, UNESP-Araraquara. Para as imagens do processo mediano do pigóforo empregou-se a padronização 100X. As imagens obtidas foram tratadas em software, a seguir descritas e comparadas.

3.2.2 Preparo e análise da genitália externa feminina

Para a análise da genitália externa feminina foram selecionados 10 espécimes adultos por espécie, de acordo Rosa *et al* (2014).

A genitália foi seccionada, a partir de corte transversal realizado próximo ao 6º segmento abdominal. Para a limpeza desidratação as amostras, foram tratadas em com série alcoólica (3 min – em álcool a 60%, 3 min – em álcool a 70%, 3 min – em álcool a 80%, 3 min – em álcool a 90%, 3 min – em álcool a 100%, 2 min – em acetona) com auxílio de cuba lavadora ultra-sônica Ultracleaner 1650 – UNIQUE, e secos em estufa a 40° como descrito a seguir:

Para o exame em MEV, as amostras foram fixadas pelo 6º segmento abdominal de modo que a porção terminal forme um ângulo de 90 ° com a base de apoio, a fixação foi por meio de esmalte para unhas incolor em toros de alumínio medindo 10 mm de diâmetro por 5 mm de altura. A seguir foi feita a metalização por 80 segundos a 10 mA com ouro.

Utilizando um MEV Topcon SM-300 do Instituto de Química, UNESP-Araraquara, as amostras foram observadas e fotografadas na posição dorsal, ventral e posterior, empregando aumento padronizado para todas amostras de 20X para imagens da vista dorsal e ventral e 50X para posterior.

As imagens obtidas foram tratadas em software, descritas e comparadas.

3.2.3 Aspectos morfológicos de ovos.

Os aspectos morfológicos dos ovos foram explorados por MEV, foram selecionadas 10 amostras para cada espécie provenientes de colônias mantidas em nosso Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual Paulista - Campus de Araraquara (FCF-UNESP/Araraquara), com exceção das amostras de *T. patagonica* que são provenientes da coleção de ovos do Prof. Tit. José M.S Barata hoje que se encontra depositada na coleção de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP- Araraquara/SP.

Os ovos limpos foram fixados em toros de alumínio medindo 10 mm de diâmetro por 5 mm de altura com uma pequena quantidade de esmalte para unhas incolor. Para

metalização com ouro carbono, a pulverização utilizada foi 80 segundos a 10 mA, como descrito por Rosa *et al* (2014).

As amostras foram observadas e fotografadas em um MEV Topcon SM-300 (Instituto de Química, UNESP-Araraquara). Avaliamos os aspectos gerais de cada amostra e arquitetura celular da área mediana dos exocorios, seguindo aumento padronizado de 50X na caracterização do aspecto geral e 1000X na caracterização do aspecto exocorial. As imagens selecionadas foram tratadas em software, descritas e comparadas.

3.2.4 Estudo histológico de ovos.

Os estudos histológicos de ovos, foram realizados no Laboratório de Processamento Histológico da Faculdade de Odontologia – UNESP/ Araraquara, seguindo protocolo adaptado de Obara *et al*, (2007) descrito a seguir:

Para as análises selecionou-se cinco ovos eclodidos de cada espécie, separados em béquer de 10ml; a seguir lavados com série alcoólica (3 min – em álcool a 60%, 3 min – em álcool a 70%, 3 min – em álcool a 80%, 3 min – em álcool a 90%, 3 min – em álcool a 100%, 2 min – em acetona) em cuba ultra-sônica Ultracleaner 1650 – UNIQUE, secos em estufa a 40°C por 30 minutos.

Após o processo de lavagem os ovos foram condicionados em pequenos cassetes de plásticos, assim submersos em solução de formaldeído por 12 horas. Após o período, os cassetes contendo as amostras, foram imersos em solução descalcificadora de “Morse” (50% ácido fórmico + 50% água deionizada), por 20 minutos. Para remoção da solução de Morse, as amostras foram mantidas em solução de sulfato de sódio a 5%, por 3 horas, e posteriormente em álcool 70% por 12 horas.

Para o processo de desidratação das amostras, as mesmas, passaram por série alcoólica: 1 hora em álcool 90% e 4 horas em álcool absoluto (a cada uma hora o álcool era substituído); 30 minutos em álcool/ xilol (50% álcool absoluto + 50% xilol). Diafanizados em xilol por 2 horas (substituído na primeira hora). As amostras foram incluídas em parafina em duas etapas, visando uma melhor impregnação da mesma, na primeira etapa as amostras, ficaram por um período de 12 horas em estufa a 40°C, e a segunda etapa por um período de uma hora em estufa a 60°C. Para uma melhor inclusão as amostras em parafina passaram por

estufa a vácuo por 30 minutos. Em sequência, incluídos em parafina líquida em inclusor Leica® EG1150.

Posteriormente, as amostras foram cortadas em micrótomo Leica® RMS2125 RTS com espessuras de 5 µm, e coradas com Hematoxila de Harris (5 a 10 minutos) e Eosina de Lison (5 minutos). Os cortes já corados foram montados entre lamina/lamínula e observados em microscópio Leica® Leitz DM RXE com câmera digital.

3.3 Estudos morfométricos.

3.3.1 Morfometria de ovos.

Para este estudo foram mensuradas 50 exocórios de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* por meio de morfometria tradicional, considerando as distancias lineares entre dois pontos de referência, de acordo com Dujardin (1999). As imagens foram capturadas com auxílio de lupa estereoscópica LEICA®MZ APO acoplada à câmera digital, todas as imagens foram capturas respeitando o aumento de 63x. As mensurações foram realizadas com auxílio de *software Motic® Images Advanced 3.2*.

As variáveis de comprimento, largura e perímetro da abertura do opérculo mensuradas foram de acordo Barata (1981), Rosa *et al* (2000) e Medonça *et al* (2016) (Fig. 1).

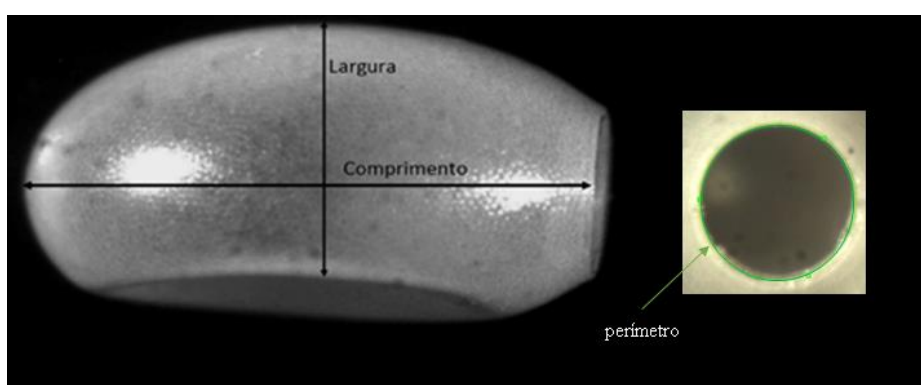


Figura 1. Imagem representando os parâmetros mensuradas para os estudos morfométricos das cascas de ovos, espécie *T. guasayana*. Comprimento, largura e perímetro da abertura opercular dados em milímetros, de acordo Barata (1981), Rosa *et al* (2000) e Medonça *et al* (2016).

3.3.2 Análises estatísticas.

As variáveis de comprimento, largura e perímetro da abertura opercular dos ovos foram avaliadas estatisticamente, estimou-se média e desvios padrões. Para testar a igualdade das variâncias, realizou-se o teste de Bartlett's.

As variações entre os parâmetros foram estimadas por Análise de Variância (ANOVA). As comparações entre as médias foram estimadas pelo teste de Turkey buscando descrever as relações entre as espécies estudadas, empregando valores de p menores ou iguais a 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism version 5.00* para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com".

3.3.3 Morfometria geométrica.

3.3.3.1 Preparo e escolha dos marcos anatômicos.

Para os estudos foram removidas aleatoriamente 30 asas esquerdas de cada população estudada, foram avaliadas asas de machos e fêmeas (separadas). As asas foram dispostas entre lâminas e lamínulas (Fig. 2), e digitalizadas com auxílio de microscópio estereoscópio LEICA®MZ APO com câmera acoplada.



Figura 2. Asas esquerdas de *T. sordida* em lâminas permanentes para digitalização das imagens.

As coordenadas resultantes de 9 marcos anatômicos (Fig.3), caracterizadas por conexões e intersecções das asas foram definidas, com base nas características anatômicas das espécies e revisão literária (MONTEIRO & REIS, 1999; JARAMILLO et al, 2002; GURMIEL et al, 2003; GURGEL, 2008).

As inserções dos marcos anatômicos foram realizadas no programa *CLIC* (*Collection of Landmarks for Identification and Characterization*, Copyright ©2000 Jean-Pierre Dujardin, www.mome-clic.com/).

As inserções dos marcos foram efetuadas respeitando mesma sequência de marcações para cada indivíduo, método importante para estabelecer a homologia espacial da estrutura, as marcações foram realizadas manualmente e repetidas três vezes procurando eliminar possíveis erros. Cada marco anatômico corresponde a uma coordenada em um plano cartesiano, desta forma para cada asa digitalizada obteve-se 9 coordenadas no eixo X e Y (Fig. 4) e cada imagem é representada por uma matriz de 9 coordenadas, respectivamente, os marcos escolhidos para melhor representar a estrutura são do tipo 1 e 2, de acordo com Monteiro & Reis (1999), marcos do tipo 1 são categorizados pelo ponto de encontro de três estruturas, ou seja, justaposição de tecidos, no caso das asas de triatomíneos a intersecção das veias, e o tipo 2 são relacionados a ponto máximo de curvatura.

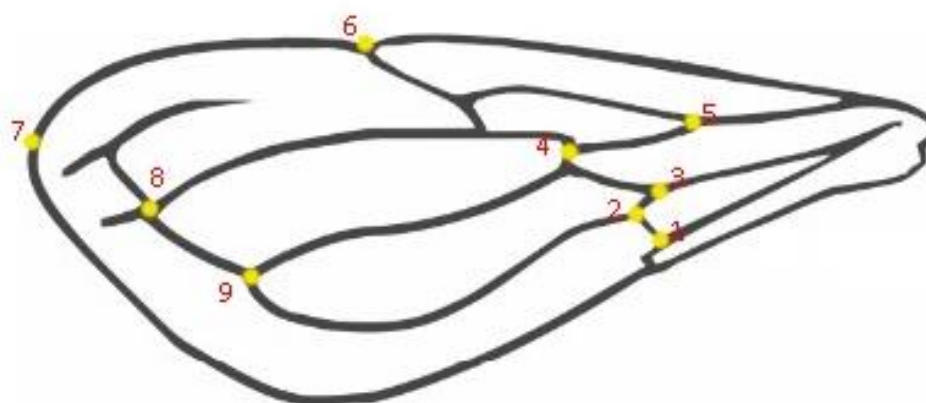


Figura 3. Vista dorsal da asa esquerda de *T. sordida*, com a posição dos 9 marcos anatômicos selecionados, marcos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 de tipo 1 e 7 de tipo 2, intersecção entre as veias, de acordo com Monteiro & Reis (1999).

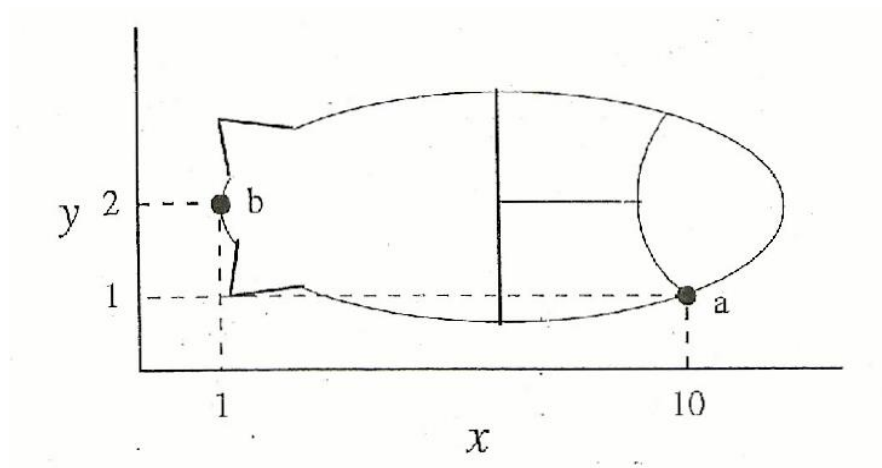


Figura 4. Representação gráfica dos marcos anatômicos e sua disposição em um plano cartesiano. Adaptado Monteiro & Reis (1999).

3.3.3.2 Sobreposições dos marcos anatômicos.

As variáveis de forma foram obtidas pelo Método de Sobreposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes (Figura 5), no programa *MORPHOJ* Versão 2.0 (KLINGENBERG, 2011).

Uma forma básica de analisar e comparar variações de forma em estruturas correspondentes é sobrepô-las e avaliar as diferenças entre os referenciais (ROHLF, 1999). Segundo, Monteiro e Reis (1999) os métodos de superposição colocam as configurações (ou seja, conjuntos de marcos) em diversos espaços, mas com a relação constante e conhecida.

O Método de Sobreposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes (ROHLF, 1999) consiste basicamente em três etapas:

1. Superimposição, que corresponde à eliminação do efeito posição, nesta etapa também conhecida como translação o centroide, ou seja o ponto médio de cada configuração é deslocado para a origem do plano cartesiano, com as configurações centradas o efeito da posição dos marcos é eliminado.
2. Proporcionalização, no qual o tamanho do centroide de cada configuração é proporcionalizado para uma medida única, assim todas configurações são igualadas a 1, eliminando o efeito de tamanho e de posição, desta forma todos valores se equivalem.

3. Rotação, em que as imagens são rotacionadas de modo que os marcos anatômicos se ajustem pela menor distância possível, eliminando o efeito da orientação.

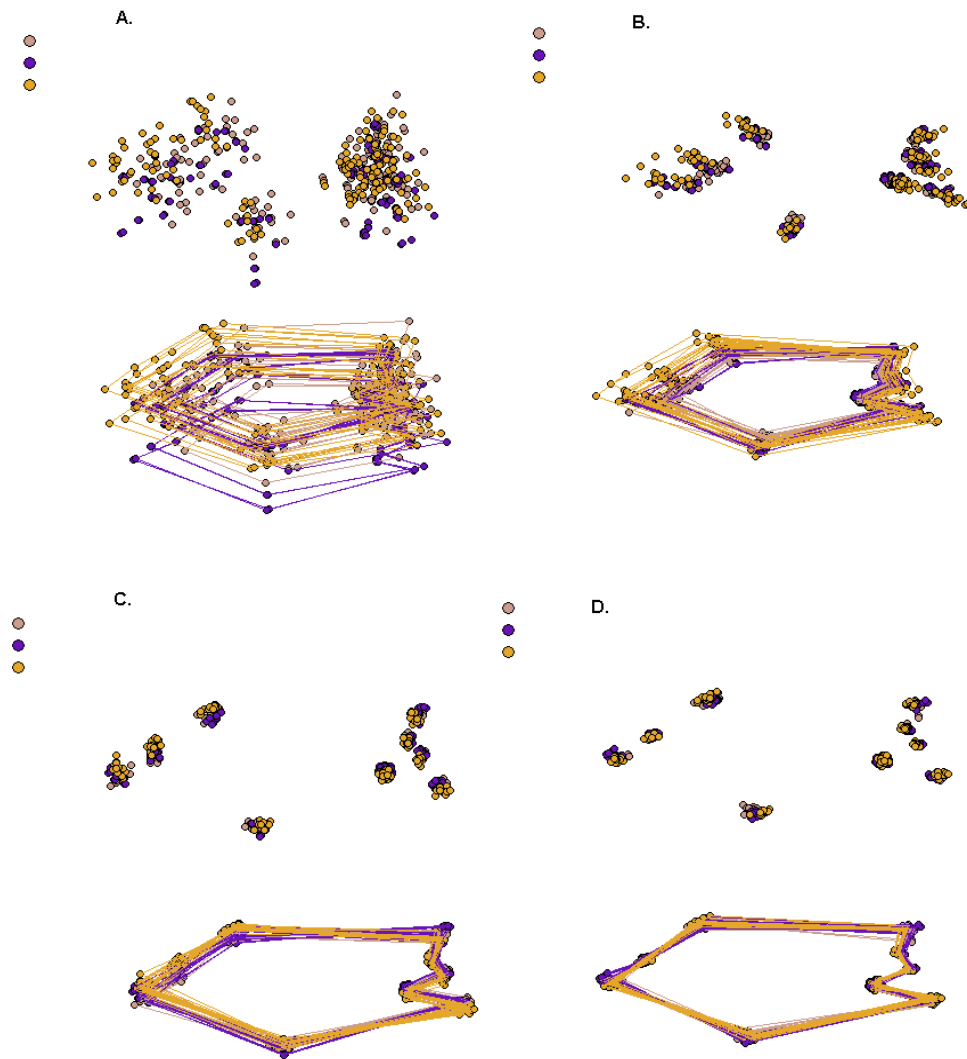


Figura 5. Representação do alinhamento das configurações individuais pelo Método de Superposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes no programa Clic. As populações hipotéticas estão representadas por cores distintas (Rosa, roxo e amarelo). A. Marcos anatômicos individuais resultantes das inserções dos referenciais, abaixo os pontos de cada marco anatômico ligado. B. Superimposição C. Proporcionalização. D. Rotação. Podemos notar que por meio da superposição, temos como resultado uma configuração média, denominada configuração consenso, assim podemos eliminar o fator posição (MONTEIRO & REIS, 1999).

Como resultado obtém-se uma matriz correspondente a variáveis de forma (MONTEIRO & REIS, 1999) em que são avaliadas mudanças nos pontos de referência pelo de método Funções de Placas Finas. Logo, com as configurações consenso resultantes do método de Sobreposição dos Quadrados Mínimos de Procrustes, podemos analisar as variações de forma, considerando a exclusão de fatores como tamanho, posição e orientação.

3.3.3.3 Funções de Flexões de Placas Finas.

A partir da padronização das configurações consegue-se uma matriz de variável de forma global, que possibilita analisar diferenças atribuídas a forma da estrutura. (MONTEIRO & REIS, 1999). Para estabelecer as variações da conformação em escala global, obtem-se os componentes uniformes (mudanças generalizadas na forma da estrutura), originados a partir da configuração consenso, e para descrever as variações localizadas os componentes não-uniformes (MORAES, 2003), estes parâmetros matemáticos baseiam-se no conceito das Funções de Flexões de Placas Finas, um modelo físico de deformação de uma placa de metal de espessura desprezível e infinitamente grande, que permite descrever as diferenças entre duas conformações de pontos como uma deformação contínua, ou seja podemos avaliar modificações em marcos anatômicos interpolando as coordenadas do pontos individuais de cada espécime em paralelo a configuração consenso (MONTEIRO & REIS, 1999, MORAES, 2003).

Em síntese, por meio dos componentes uniformes e não- uniformes podemos exprimir informações acerca das variações de forma da estrutura, e apresenta-las de forma gráfica através de grades de deformações (MORAES, 2003).

Em termos gerais, por meio da configuração consenso obtem-se uma Matriz de Energia de Deformação, assim podemos definir parâmetros para as análises de deformações das grades (Fig.6). Está matriz é decomposta gerando duas matrizes singulares, estas matrizes descritas como matrizes de autovalores e a correspondente de autovetores apresentam valores associados (MORAES, 2003).

As matrizes autovetores são as deformações principais (*Principal Warps*) e descrevem os principais eixos de deformação entre as amostras. A matriz correspondente são as de

autovalores (*Partial Warps*) e descrevem as variações nas coordenadas de cada espécime em relação a configuração consenso. Em termos gerais, as deformações principais representam o consenso das configurações e as deformações parciais referem-se aos indivíduos. (MORAES, 2003)

As deformações principais e parciais foram obtidas no programa *MORPHOJ* Versão 2.0 (KLINGENBERG, 2011) as deformações são apresentadas por meio de vetores que descrevem mudanças no sentido e direção da deformação em cada marco, primeiro de forma generalizada, segundo pontuais (MORAES, 2003).

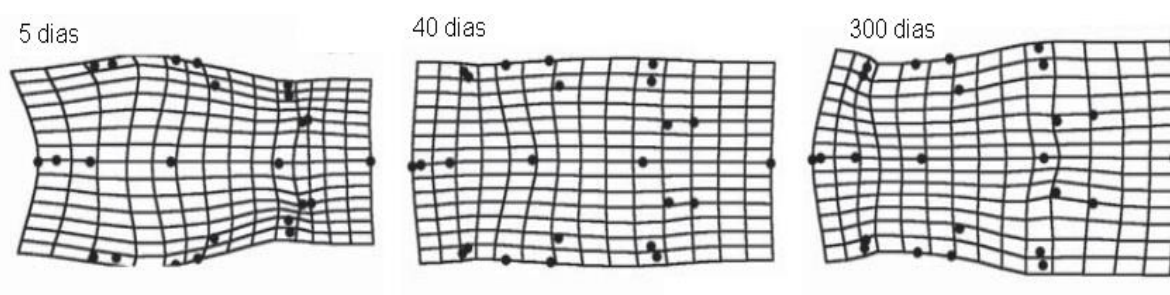


Figura 6. Exemplos de Grades de deformações originadas a partir de uma configuração consenso, adaptado de Moraes (2003) cada grade representa as configurações individuais de crânios de espécimes de *Calomys tener* (Rodentia, Sigmodontinae), podemos notar diferenças nas grades de deformações, o autor descreve que foi possível por morfometria geométrica caracterizar as modificações pontuais na forma do crânio destes roedores em períodos diferentes de desenvolvimento (5, 40 e 300 dias).

3.3.3.4 Tamanhos do Centróide e variações no tamanho.

O tamanho do centróide, correspondente a uma medida multivariada de tamanho, foi obtida por meio do programa *CLIC* (*Collection of Landmarks for Identification and Characterization*, Copyright ©2000 Jean-Pierre Dujardin, www.mome-clic.com).

Os valores obtidos através das medições do tamanho do centróide foram utilizados para comparar as asas pelo tamanho e análise de dimorfismo sexual. Segundo, Moraes (2003) o Tamanho de Centróide corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada ponto de referência e o centro de massa, ou centróide. O centróide em

figuras planas é utilizado em equações matemáticas onde considere-se todas as propriedades concentradas em um ponto único (BOOKSTEIN, 1991).

Para determinar possíveis diferenciações na forma ou tamanho, realizou-se o teste ANOVA de Procrustes, estabeleceu-se os desvios médios a partir dos valores das coordenadas de Procrustes. A técnica funciona de forma análoga a ANOVA convencional, onde as coordenadas de Procrustes alinhadas são utilizadas como dados. (KLINGENBERG & MCINTYRE 1998). As análises foram realizadas no programa *MORPHOJ* Versão 2.0 (KLINGENBERG, 2011).

3.3.3.5 Análise das Variáveis Canônicas.

As análises das variáveis canônicas (CVA) têm como objetivo discriminar grupos em conjuntos de dados, possibilitando a discriminação entre grupos multivariados. Neste método estatístico o interesse é verificar a magnitude das diferenças entre as populações afim de traçar diferenças fundamentando-se em um grande número de características originais correlacionadas (MONTEIRO & REIS, 1999).

Portanto, as análises das variáveis canônicas foram realizadas procurando verificar o posicionamento dos grupos dentro de um espaço multivariado resultante das variáveis canônicas. As análises foram realizadas no programa *MORPHOJ* Versão 2.0 (KLINGENBERG, 2011).

3.3.3.6 Análise Discriminante.

Para estabelecer quais variáveis foram mais significantes para discriminar os grupos, empregou a Análise discriminante, técnica de estatística multivariada que proporciona a avaliação de grupos analisados par a par, assim melhor discriminando-os. A técnica diferencia-se da CVA, por considerar apenas dois grupos ao analisar. As análises discriminantes foram realizadas no programa *MORPHOJ* Versão 2.0 (KLINGENBERG, 2011).

Foi calculada a distância de Mahalanobis, determinando as distâncias entre os grupos, esse tipo de estudo é realizado par a par, buscando agrupar os indivíduos em grupos definidos por suas características morfológicas.

3.4 Estudos moleculares.

3.4.1 Extrações do DNA genômico.

O DNA genômico (DNAg) foi extraído segundo protocolo adaptado de Bargues & Mas-Comas (1997). O tecido de escolha foi da musculatura das pernas. Os espécimes utilizados foram adultos e ninfas de 5º estágio, por oferecer quantidade maior de material, para cada população padronizou-se 3 exemplares. As pernas foram trituradas e maceradas em microtubos com 400µL de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%) com auxílio de instrumentação cirúrgica esterilizada, adicionou 100 µL (500 µl/mL) de Proteinase K (*Sigma-Adrich*®, St. Louis, MO, USA), o lisado foi homogeneizado em agitador de tubos e incubado em banho seco a 37°C por 12 horas para digestão.

A purificação do DNAg foi realizada com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico 25:24:1 (*Sigma-Adrich*®, St. Louis, MO, USA). Após a lise adicionou 400µL Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) homegenizado e centrifugado a 12.000g por 3 minutos a 4°C. Logo, transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos adicionando 2 µl de RNase A (10µg/mL) (*Sigma-Adrich*®, St. Louis, MO, USA) incubando por 1 hora em banho seco a 60°C. Pós banho, adicionou 400µL Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) homegenizado e centrifugado a 12.000g por 3 minutos a 4°C, após a separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos, repetindo o procedimento por 2 vezes. Em seguida adicionou o sobrenadante em 400µL de Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1) homegenizado e centrifugado a 12.000g por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante novamente foi transferido para novos microtubos adicionando volume de 1mL de álcool absoluto gelado (-20°C) e 40µL de acetato de amônio 4M, centrifugando a 12.000g por 20 minutos e condicionado por 1 hora a -20°C. O precipitado resultante do procedimento anterior foi lavado e centrifugado (12.000g por 10 minutos) por duas vezes com álcool 70% a -20°C. Logo, o álcool foi cuidadosamente descartado deixando secar em temperatura ambiente até completa evaporação. O pellet foi eluído entre 30 a 50 µL de água purificada no sistema Milli-Q® (Merck Millipore Corporation) condicionando a -20°C até e uso.

A pureza do material foi verificada em gel de agarose a 1% (5µL de DNA+1µL *Dye Front 6X*+ 2µL de *GelRed*™ (1:10.000X)) a corrida ocorreu por aproximadamente 40 a 60

minutos a 80V em tampão TAE 1X. A migração foi visualizada em luz ultravioleta em transiluminador (SAMBROOK et al, 1989).

3.4.2 Amplificações do DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

As reações da cadeia de polimerase foram realizadas em termociclador T100™ *Thermal Cycler* (BIORAD® *Laboratories, Inc.*). Um volume final de 50µL de produto de PCR seguindo as condições de aproximadamente 30 a 100ng de gDNA, 1 µL de dDNTP Mix 2mM (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 10 picomoles de cada iniciador, ~3- 4µL de MgCl₂ 25mM, 1.25 U de enzima *Taq DNA Polymerase High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo Fisher Scientific ©) em 5 µL de tampão 10X, o volume final ajustado com água Milli-Q®.

As condições da PCR variaram de acordo com cada gene, descritos abaixo:

As condições de amplificação para o gene CO1 foram: ciclo a 94° C por 5 minutos, seguido por trinta e cinco ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos minutos, finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos.

As condições de amplificação para o gene *Cyt b* foram um ciclo a 94° C por 5 minutos, seguido por trinta e cinco ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e 30 segundos minutos, finalizando com um ciclo de 72°C por 7 minutos.

As condições de amplificação para o gene 28S foram um ciclo a 94° C por 5 minutos, seguido por trinta e cinco ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 7 minutos.

As condições de amplificação para o gene ITS-1 foram um ciclo a 94° C por 5 minutos, seguido por trinta e cinco ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos.

As condições de amplificação para o gene ITS-2 foram um ciclo a 94° C por 5 minutos, seguido por trinta e cinco ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos.

A confirmação da amplificação de cada gene foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1.5% (5µL de amostra + 1µL de *Dye Front* 6X + 2µL de *GelRed*™ 1:10.000X), seguindo peso molecular (1kb de *DNA Ladder* RTU KASVI).

3.4.3 Iniciadores.

Os iniciadores utilizados para as amplificações foram escolhidos por serem indicados para estudos filogenéticos com triatomíneos (Tab.2).

Tabela 2. Iniciadores utilizados no estudo.

Iniciador	Senso (<i>forward</i>)	Anti-senso (<i>reverse</i>)	Fontes
CO1	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer <i>et al</i> (1994)
<i>Cyt b</i>	5'-'GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGA TC-3'	5'-ATTACTCCTCCTAGYTTATTAGGAAT-3'	Monteiro <i>et al</i> (2003)
28S	5'-GCGAGTCGTGTTGCTTGATAGTGCAG-3'.	5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'	Porter & Collins (1991)
16S	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	5'-CTCCGGTTTGAACTCAGATCA-3	Weirauch & Munro (2009)
ITS 1	5'-TACACACCGCCCGTCGTCAC TA-3'	5'-GAGTGATCCGCCGCTCAGGGTAA3'	*
ITS 2	5'-TTCTGTTTCGACATCACGTTTTTTTG-3'	5'-CTGAGCTTCACGTACTCTTG-3'	*

* Iniciadores desenhados por Cláudia Solano Rocha, dados não publicados

3.3.4 Purificações do DNA amplificado.

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante, para sua posterior utilização na reação de sequenciamento.

3.4.5 Sequenciamentos.

Os fragmentos de DNA purificados foram submetidos a reações de sequenciamento, utilizando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits* (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas no Centro de Recursos Biológicos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, São Paulo - FCAV/UNESP (CREBIO).

3.4.6 Análises filogenéticas.

Foram analisadas sequências dos genes CO1, Cyt *b* e 28S amplificadas em nosso laboratório, as sequências do gene 16S foram obtidas no banco de dados de sequências genéticas *GenBank®* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

As sequências foram avaliadas em sua qualidade por meio de eletroferograma no programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.25 (HALL, 1999) e alinhadas no programa *ClustalW* (THOMPSON et al, 1994) implementado no programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.25 (HALL, 1999).

Os alinhamentos foram realizados em três etapas: alinhamento inicial (AI), no qual foi extraída uma sequência consenso a partir das sequências senso e antisenso obtidas para cada fragmento sequenciado, sendo três para cada espécie (triplicata); depois alinhou-se por espécie (AE), assim obteve-se uma sequência para cada espécie; e a terceira etapa o alinhamento geral (AG), que se baseia no alinhamentos das sequências AE com as de Triatominae disponíveis no *GenBank®* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

As análises filogenéticas com as sequências correspondentes aos genes CO1, Cyt *b*, 28S e 16S foram realizadas utilizando-se do programa *MEGA 7.0.14* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*- <http://www.megasoftware.net/>) e os parâmetros analíticos de máxima verossimilhança (ML) e de distância (*Neighbor-Joining*- NJ). Para as análises de distâncias

foram utilizados dois parâmetros para a construção das matrizes: o Kimura de dois parâmetros (Kimura 2) e o *Maximum Composite Likelihood* (MCL) (KUMAR et al, 2005).

Os filogramas foram gerados pelo programa Mega e os valores de *Bootstrap* foram suportados por 1.000 replicações. Nessas análises utilizou-se do alinhamento AG.

Com finalidade de verificar se os genes sequenciados representavam o esperado para a espécie, avaliou-se por meio da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Aligment Search Tool*) disponível em plataforma *online* pelo site do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a ferramenta procura correlacionar as sequências obtidas com as depositadas no banco de dados do *GenBank*®.

As análises bayesianas com os genes CO1, *Cyt b*, 28S e 16S concatenados foram realizadas usando o programa MrBayes versão 3.2 (RONQUIST et al, 2011). Para atribuir o melhor ajuste de substituição nucleotídica para os dados obtidos usamos o programa *MrModeltest* 2.3 (NYLANDER, 2004) definindo o melhor ajuste para GTR + G segundo critério de informação Akaike gerado pelo programa.

Os filogramas consenso foram gerados no programa *FigTree* versão 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Estudos morfológicos.

4.1.1 Processo mediano do pigóforo.

Por meio das observações das imagens de MEV notou-se uma leve homogeneidade entre os PrP das espécies do subcomplexo (Fig. 7). As imagens demonstram poucas diferenças entre amostras estudadas, impossibilitando a diagnose específica.

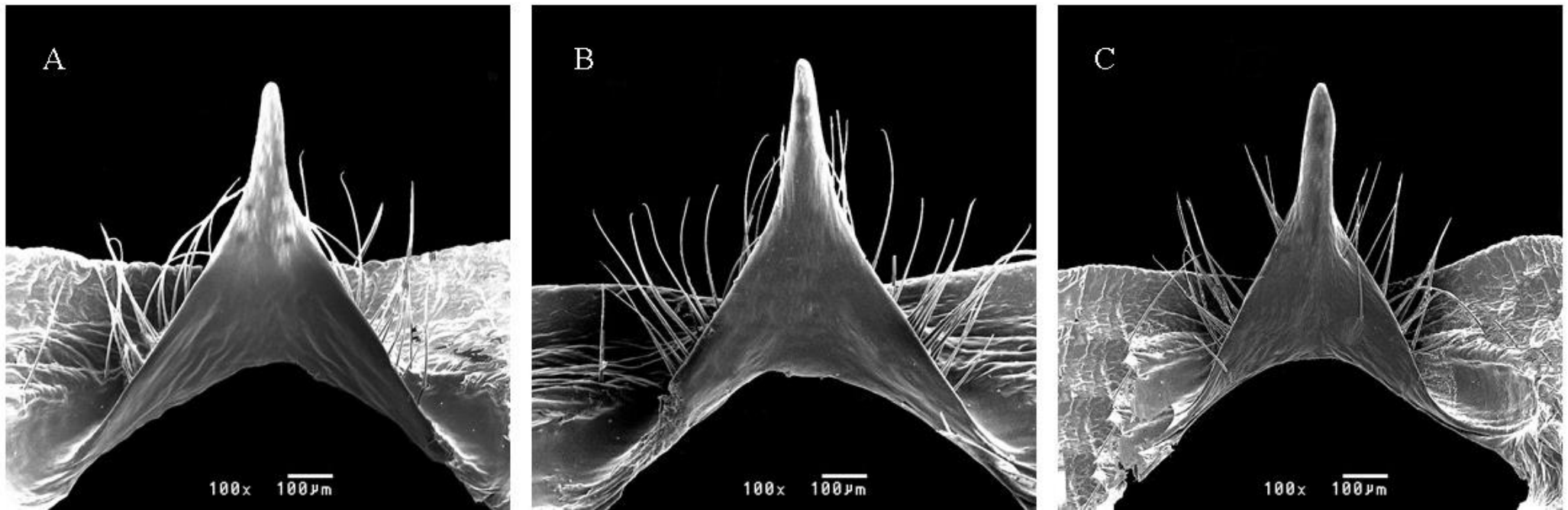


Figura 7. Processo mediano do pigóforo por MEV. A. *T. garciabesi*, B. *T. guasayana* e C. *T. sordida*.

4.1.2 Genitália externa feminina.

Os aspectos gerais das genitálias externas femininas analisadas por MEV ofereceram informações importantes a respeito da anatomia da estrutura estudada, bem como mostrou-se adequado para caracterização específica.

As observações das imagens em vista dorsal mostram diferenças entre as quatro espécies, destacadas abaixo (Fig. 8).

1. A forma do décimo segmento abdominal;
2. Forma e tamanho do nono segmento abdominal.
3. Forma e tamanho do oitavo segmento abdominal.

Ao avaliar as imagens da vista posterior da genitália externa destaca-se as principais características (Fig. 9).

- 1) A linha que divide o nono e décimo segmento;
- 2) Forma e tamanho do nono segmento abdominal;
- 3) Forma e tamanho do décimo segmento abdominal;

Em posição ventral pode-se destacar as seguintes características (Fig. 10).

- 1) A linha anatômica que divide o sétimo e oitavo segmento abdominal;
- 2) Diferenças na forma e tamanho da oitava gonocoxito;
- 3) O tamanho da oitava gonapofise;
- 4) A forma do nono segmento;
- 5) A forma do décimo segmento.

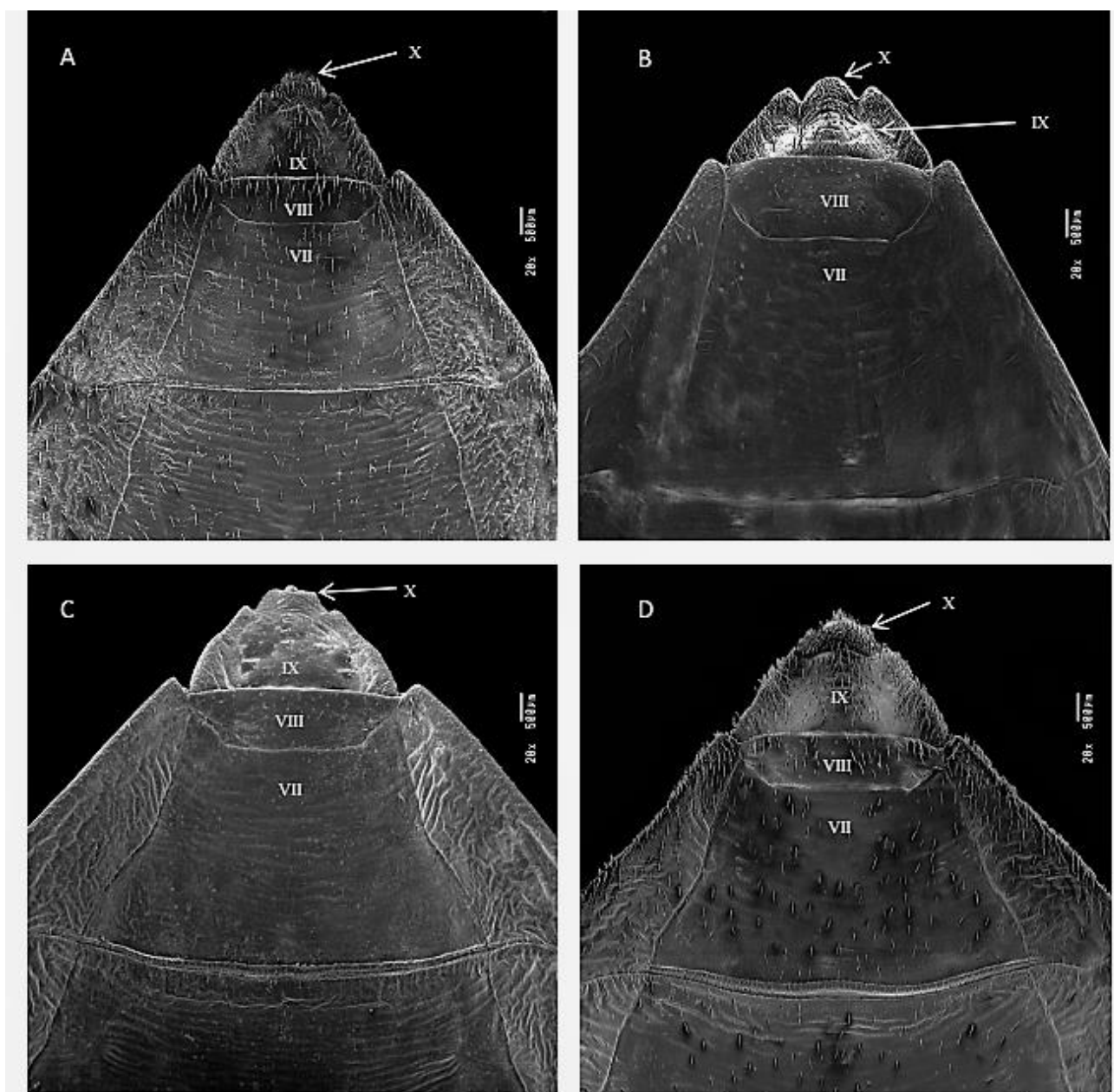


Figura 8. Genitalia externa feminina de quatro espécies do subcomplexo *T. sordida* em vista dorsal. A: *T. garciabesi*, B: *T. guasayana*, C: *T. patagonica* e D: *T. sordida*. Gc8: gonacoxito 8, Gp8: gonapofise 8, VII e VIII tergitos, IX e X segmento.

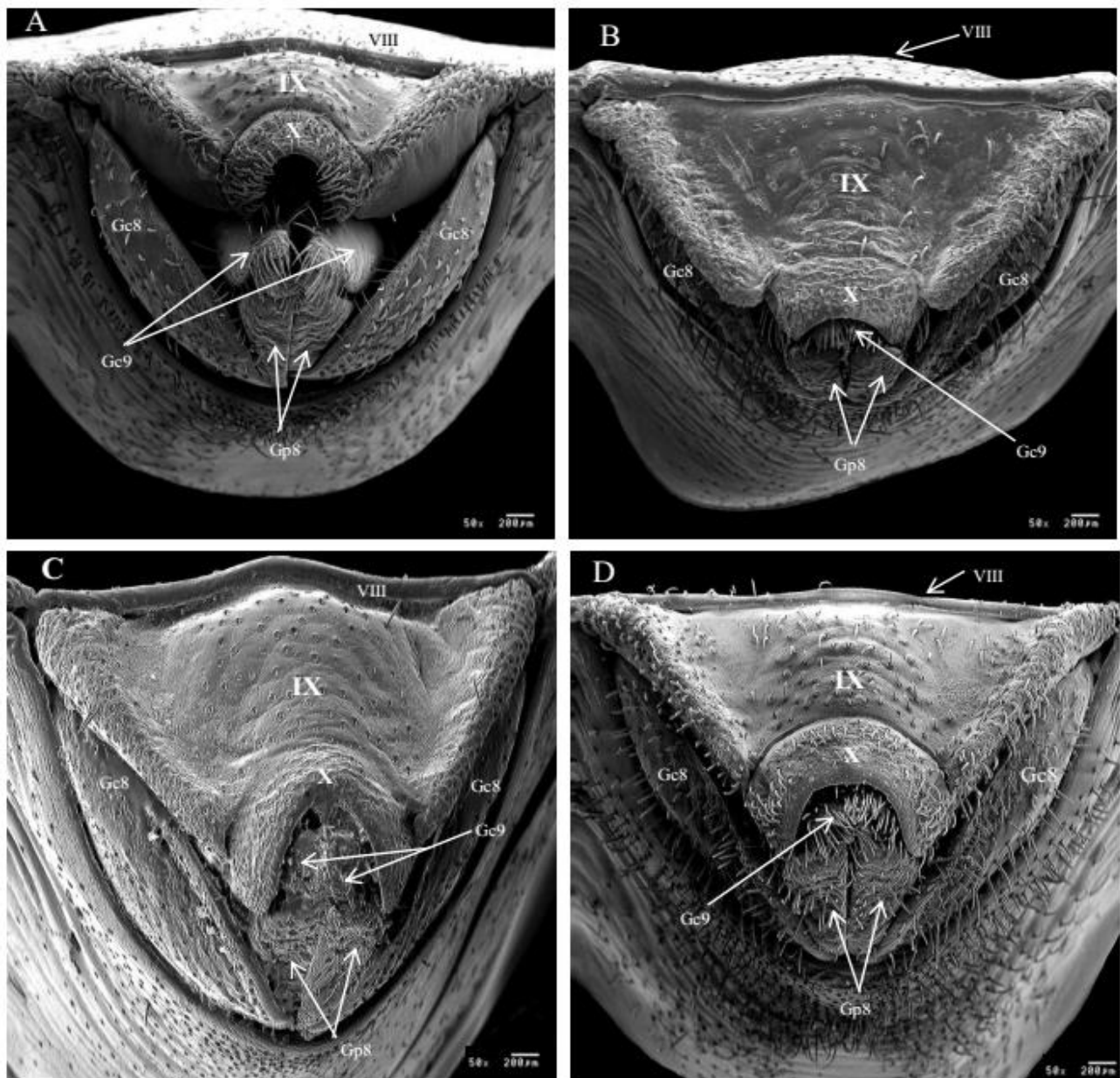


Figure 9. Genitália externa feminina de quatro espécies do subcomplexo *T. sordida* em vista posterior. A: *T. garciabesi*, B: *T. guasayana*, C: *T. patagonica* e D: *T. sordida*. Gc8: gonacoxito 8, Gp8: gonapofise 8, VIII tergito, IX e X segmento

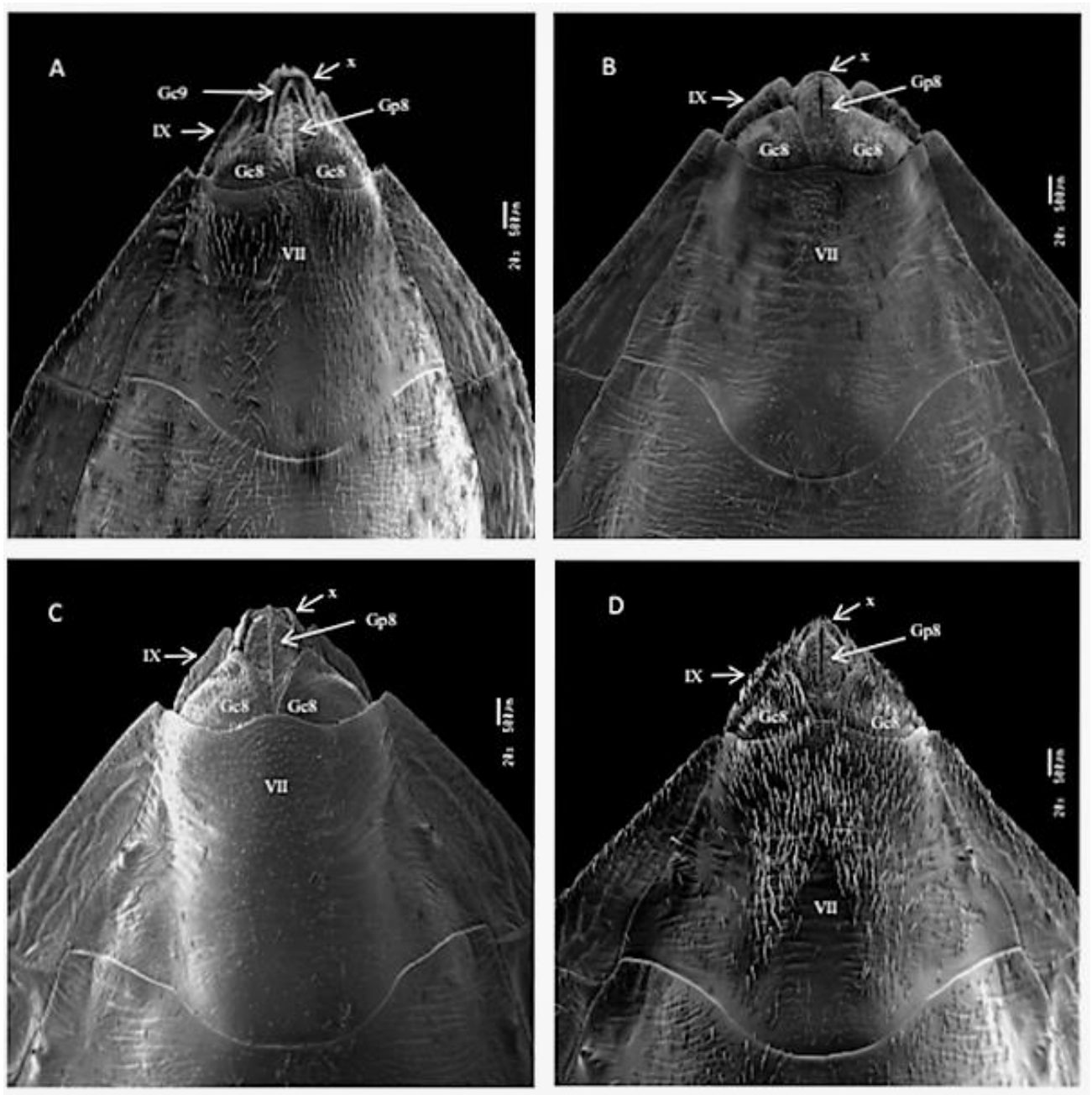


Figure 10. Genitália feminina externa de quatro espécies do subcomplexo *T. sordida* em vista ventral. A: *T. garciabesi*, B: *T. guasayana*, C: *T. patagonica* e D: *T. sordida*. Gc8: gonacoxito 8, Gp8: gonapofise 8, VIII tergito, IX e X segmento.

Portanto, as avaliações realizadas por meio de MEV oferecem novas informações a respeito da morfologia das espécies estudadas, assim é possível validar a genitália externa feminina como parâmetro de discriminação específica para o subcomplexo *T. sordida*. As principais características estão sumarizadas na tabela 3.

Tabela 3. Principais características encontradas na vista dorsal, posterior e ventral da genitália externa feminina de espécies do subcomplexo *T. sordida*

Espécies	Vista dorsal	Vista posterior	Vista ventral
<i>T. garciabesi</i>	8º segmento curto.	Forma curva do 10º segmento.	Gonocoxitos arredondados, gonapofises curtas.
<i>T. guasayana</i>	8º segmento longo, 10º entre as extremidades do 9º.	Comprimento do 9º segmento e limite com o 10º.	Gonocoxitos triangulares, 10º entre as extremidades do 9º.
<i>T. patagonica</i>	10º segmento trapezoidal, 9º com extremidades curtas.	Forma e tamanho do 10º segmento.	Gonocoxitos grandes, final do 10º em linha reta.
<i>T. sordida</i>	7º segmento curto, 9º segmento longo.	Comprimento e forma do 10º segmento	Limite entre o 9º e 10º segmentos em linha contínua.

4.1.3 Morfologia dos ovos.

Os aspectos morfológicos dos ovos foram individualmente descritos, nota-se pequenas diferenças entre as espécies estudadas, as características individuais encontram-se descritas abaixo:

Triatoma garciabesi: Aspecto elipsoide, com células exocóricas constituído por forma poligonais que variam entre pentagonais, hexagonais e em menor número heptagonais, células com numerosas perfurações que se distribuem aleatoriamente pela célula poligonal orifícios nas limitações bem evidentes, opérculo circular sem colarinho (Figs. 11A e 12B).

Triatoma guasayana: Aspecto geral elipsoide levemente achatado, células exocóricas predominantemente com polígonos irregulares, com maior predominância de formas hexagonais e em menor número pentagonais, numerosas perfurações pelo corpo das células, linha limitante entre as células levemente sulcadas, opérculo circular estreito, ausência de colarinho (Figs. 11B e 12B).

Triatoma patagonica: Elipsoide e alongado, células exocóricas uniformes formados por polígonos simétricos com predominância de formas hexagonais e em pequeno número pentagonais, presença de perfurações, linha limitante salientes e retilínea, região cefálica do ovo levemente achatada, abertura opercular circular, sem presença de colarinho (Figs. 11B e 12C).

Triatoma sordida: Aspecto geral elipsoide alongado, achatado lateralmente, células exocóricas ornamentadas por polígonos irregulares com predominância de hexágonos e pentágonos, inúmeras perfurações distribuídas pelo corpo celular, linha limitantes evidentes, abertura opercular circular, sem presença de colarinho (Figs. 11B e 13C).

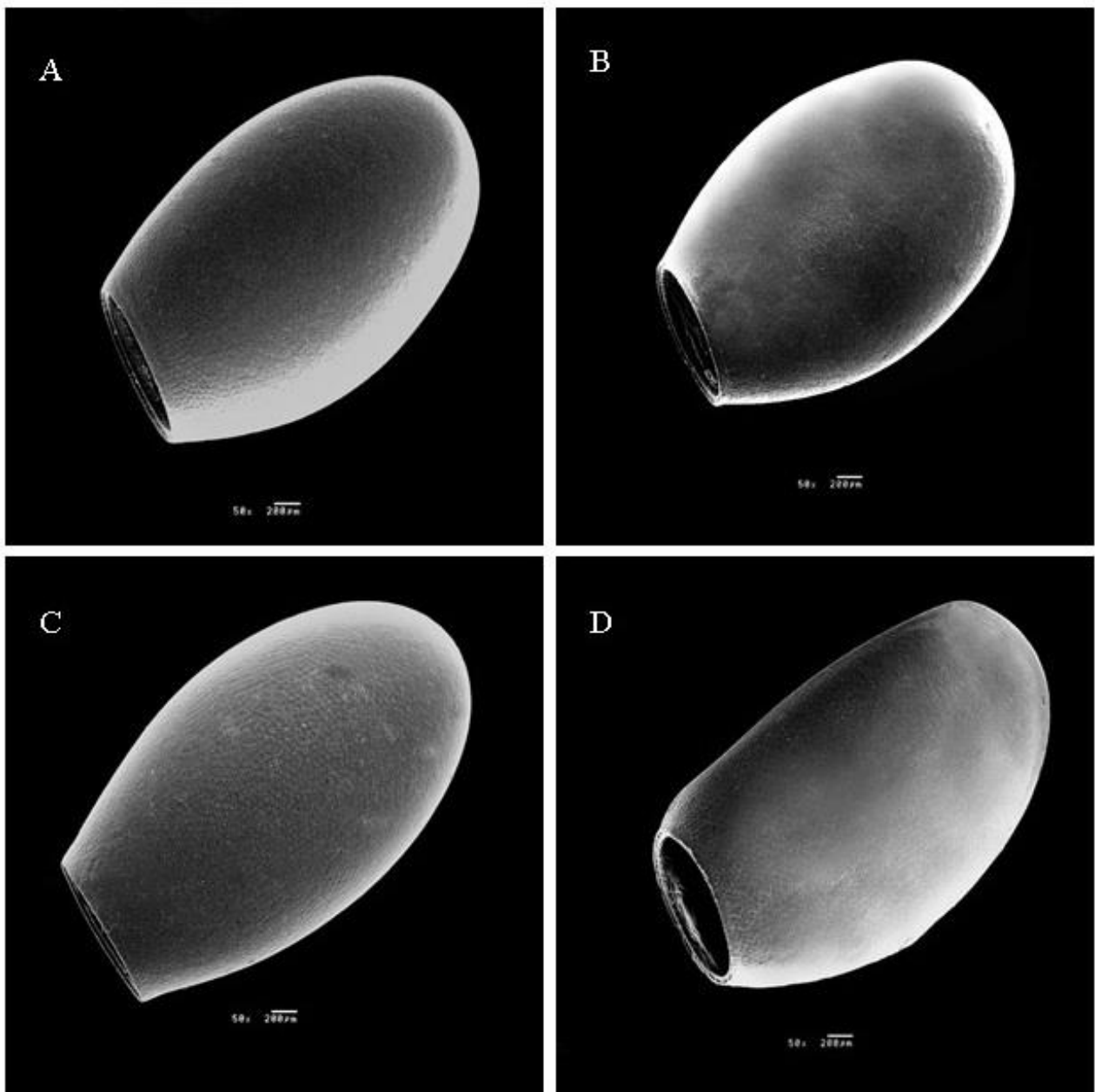


Figura 11. Aspecto geral de ovos estudados por MEV (50X). A. *T. garciabesi*, B. *T. guasayana*, C. *T. patagonica* e D. *T. sordida*.

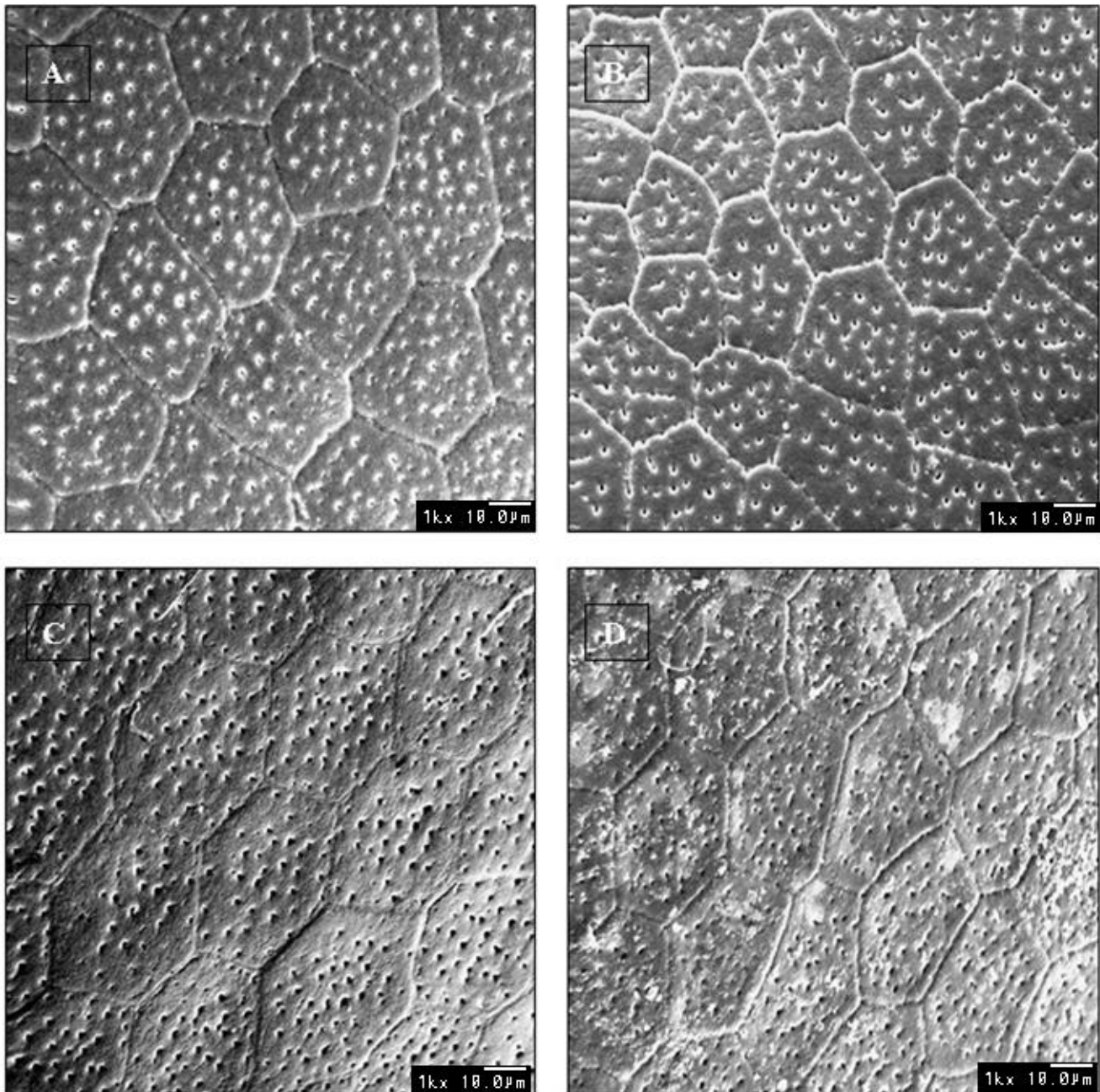


Figura 12. Detalhe da superfície exocorial de ovos por MEV (1000X). A. *T. garciabesi*, B. *T. guasayana*, C. *T. patagonica* e D. *T. sordida*.

4.1.4 Estudos histológicos dos ovos.

As lâminas referentes aos cortes histológicos com as cascas dos ovos das quatro espécies do subcomplexo *T. sordida* foram analisadas por meio de microscopia de luz. Foi possível discriminar cada espécie pela constituição tecidual no tecido (Figs. 13).

As descrições para os ovos do subcomplexo *T. sordida* corroboram com as descritas para o gênero *Triatoma* por Barata (1981).

Percebe-se por microscopia de luz quatro camadas distintas, as internas formadas pelo endocório mole e endocório rijo, e as externas formadas pelo exocório rijo e exocório mole. Devido à pouca afinidade pelo corante utilizado obteve-se padrões distintos, o exocório rijo não apresenta coloração, o mesmo para o exocório mole. Pela metodologia empregada percebemos uma maior intensidade de corante hematoxilina, formando uma fina camada “azul”, de fora para parte interna da casca, encontramos de forma difusa uma intensidade maior de coloração rosa, resultante do corante eosina, podemos visualizar de forma clara este padrão principalmente na figura 13C.

Foram percebidas diferenças na textura da camada exocórial que permitem distinguir as quatro espécies: nota-se que o exocório de *T. guasayana* e *T. sordida* é mais delgado (Figs. 14B, 13D), *T. patagonica* (Fig. 13C) o perfil é liso e levemente delgado em *T. garciabesi* (13A). O perfil delgado encontrado em algumas das espécies estudadas indicam a presença de células exocórias acolchoadas.

Em *T. patagonica* e *T. garciabesi* (Figura 13A, C) a camada basal é lisa, e levemente ondulada em *T. guasayana* e *T. sordida* (Figura 13B, D). Percebe pelas imagens que a espessura do exocório é distinta entre as espécies, *T. guasayana* apresentou aspecto largo, seguindo de *T. garciabesi* e *T. patagonica*, *T. sordida* apresentou perfil fino.

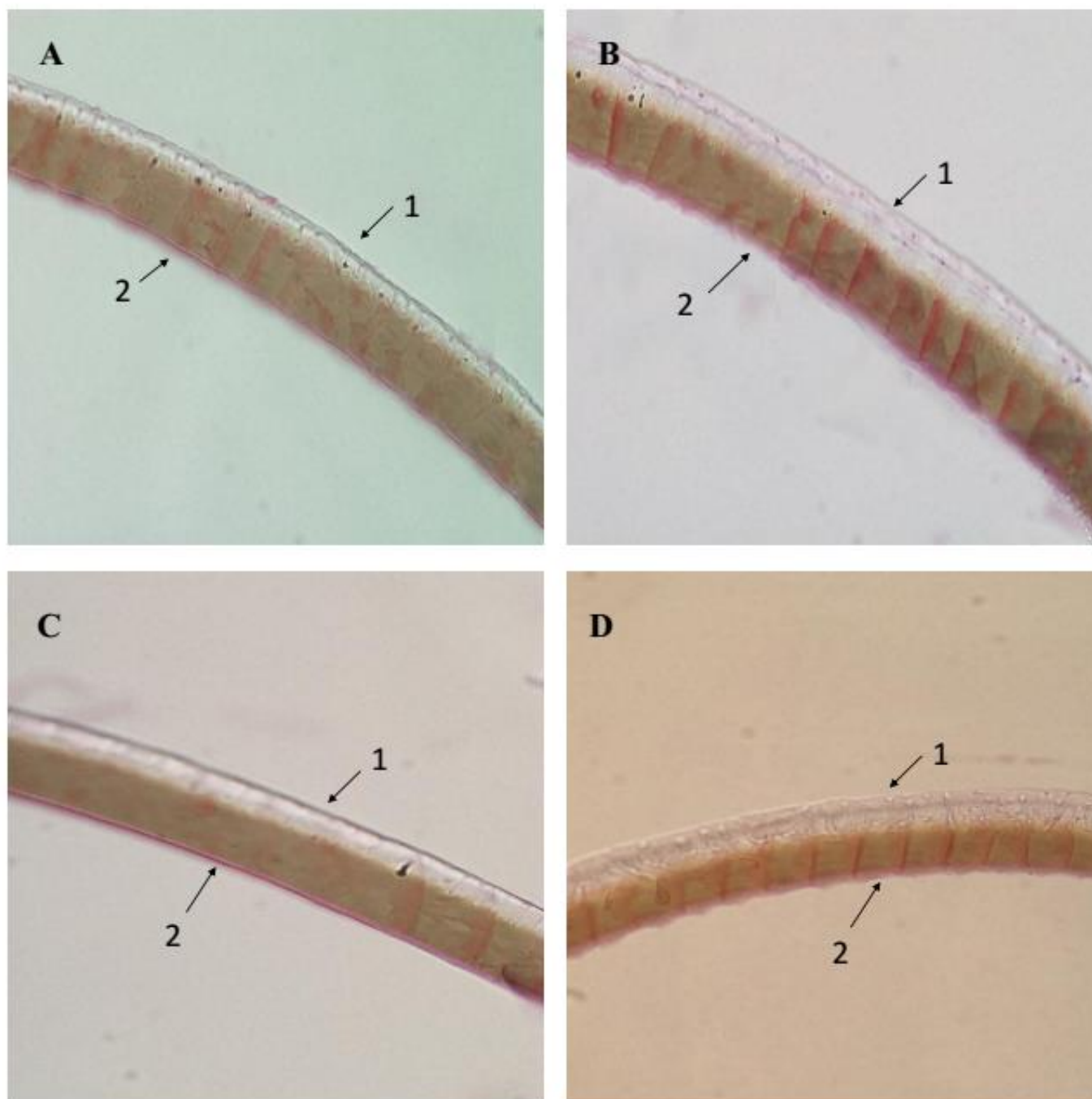


Figura 13. Imagens de cortes histológicos de cascas de ovos (100X). A. *T. garciabesi*, B. *T. guasayana*, C. *T. patagonica*, D. *T. sordida*.

4.2 Estudos morfométricos.

4.2.1 Morfometria de ovos.

Por meio dos valores médios e desvios padrões resultantes do comprimento dos ovos nota-se variabilidade entre os ovos das espécies estudadas (Tab. 4), *T. guasayana* apresentou a menor média, $1,61 \pm 0,09$ mm, seguido por *T. garciabesi* com $1,69 \pm 0,09$ mm, seguidas por *T. sordida* com $1,72 \pm 0,05$ mm. Como descrito anteriormente no estudo morfológico o aspecto alongado de *T. patagonica* $1,77 \pm 0,05$ mm foi verificado também pelo estudo morfométrico, a espécie apresenta valor mais expressivo em relação as outras espécies

As comparações entre as médias de largura revelam que os ovos apresentam valores relativamente uniformes, *T. patagonica* $0,84 \pm 0,05$ mm apresenta o maior valor médio entre as espécies estudadas. *T. garciabesi* $0,80 \pm 0,06$ mm, *T. guasayana* $0,81 \pm 0,06$ mm e *T. sordida* $0,80 \pm 0,04$ mm apresentaram valores relativamente próximos (Tab. 4).

Pelo aspecto do perímetro da abertura opercular as avaliações métricas complementam as descrições morfológicas, nota-se uma variabilidade entre as espécies. *T. garciabesi* apresentou maior valor médio $1,94 \pm 0,08$ mm, seguido por *T. patagonica* $1,84 \pm 0,10$ mm, *T. guasayana* e *T. sordida* apresentaram os menores valores, $1,43 \pm 0,08$ mm e $1,55 \pm 0,07$ mm respectivamente (Tab. 4).

Tabela 4. Resultado das mensurações, em mm, do comprimento, largura e perímetro da abertura opércular de ovos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*.

Espécie	Comprimento*				Largura				Perímetro do opérculo*			
	Min	Max	$\bar{x}$	dp	Min	Max	$\bar{x}$	dp	Min	Max	$\bar{x}$	dp
<i>T. garciabesi</i>	1,59	1,83	1,70*	0,06	0,67	0,93	0,80	0,06	1,82	2,20	1,94*	0,08
<i>T. guasayana</i>	1,33	1,79	1,61*	0,09	0,64	0,90	0,81	0,05	1,19	1,57	1,43*	0,08
<i>T. patagonica</i>	1,69	1,86	1,77*	0,05	0,67	0,96	0,84	0,05	1,65	2,03	1,84*	0,10
<i>T. sordida</i>	1,60	1,83	1,72*	0,05	0,69	0,95	0,80	0,04	1,23	1,70	1,55*	0,07

Mínimo (mín), Maximo (max), Médias ($\bar{x}$) e desvios padrões (dp), * diferenças significativas entre as espécies (análise de variância $p < 0,05$).

As diferenças estimadas por ANOVA foram consideradas significativas ao nível de significância $p < 0,05$ demonstram distinções entre os ovos das espécies estudadas, principalmente em relação ao comprimento e perímetro da abertura opercular, por outro lado, as larguras das cascas dos ovos revelam menores diferenças.

4.3. Morfometria geométrica.

4.3.1 Variabilidade de tamanho das asas entre as espécies.

Por meio do tamanho do centroide resultante da raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre cada marco anatômico e o centroide de gravidade foi possível estimar as diferenças de tamanho entre as espécies estudadas.

Os resultados referentes as variações do tamanho do centroide alares estão expressas nas figuras 14 e 15. As populações de *T. sordida* apresentaram o maior tamanho médio (Figs. 14 e 15). A maior variabilidade intraespecífica foi observada em *T. sordida* (Figs. 14 e 15). As populações provenientes do Brasil apresentam valores estatisticamente próximos principalmente entre os machos da espécie, o mesmo não percebido entre as provenientes da Argentina e Bolívia. A espécie *T. patagonica* apresenta uns dos maiores valores, tanto para macho e fêmeas, os menores valores médios foram encontrados nas populações de *T. garciabesi* e *T. guasayana* respectivamente.

As fêmeas relativamente maiores que os machos evidenciam um dimorfismo sexual consistente.

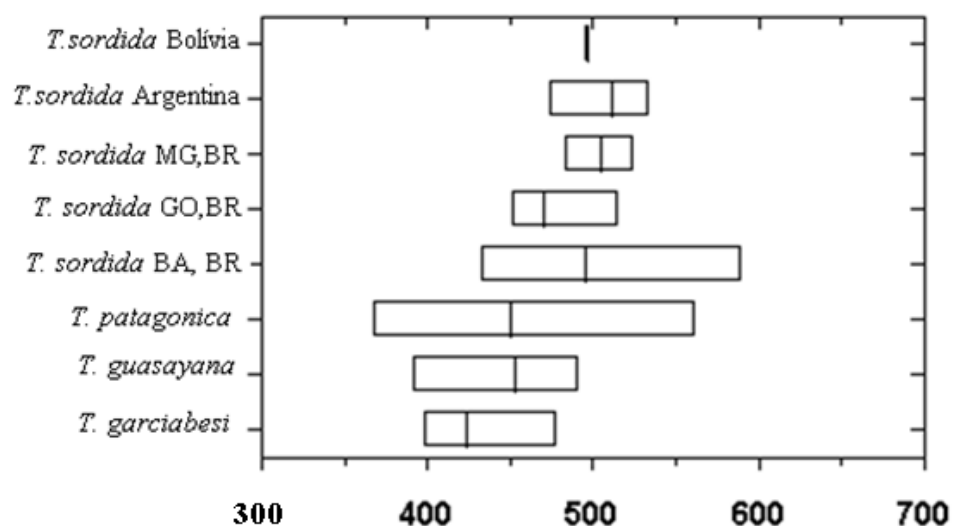


Figura 14. Variação do tamanho do centroide das asas esquerdas de machos entre populações de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). As caixas mostram os valores médios.

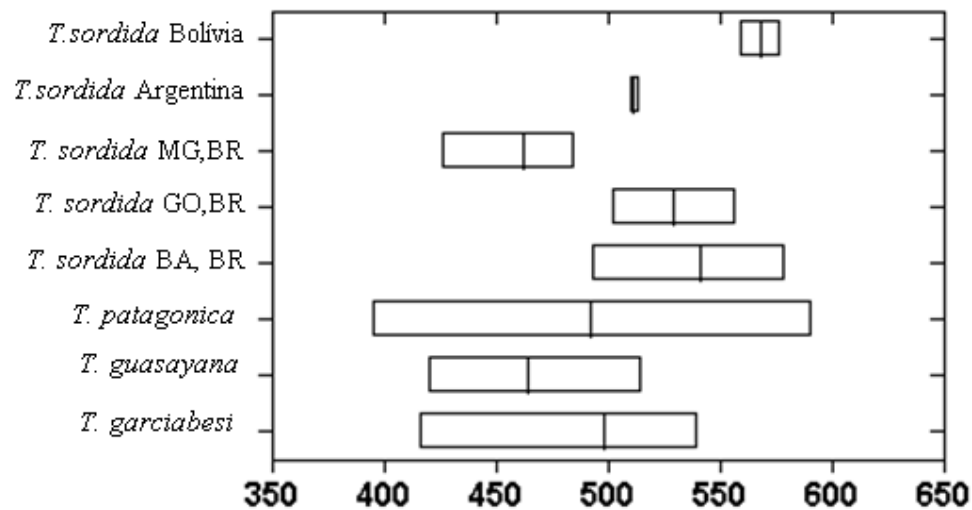


Figura 15. Variação do tamanho do centroide das asas esquerdas de fêmeas entre populações de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). As caixas mostram os valores médios.

Os resumos das análises do tamanho do centroide por meio de ANOVA (machos e fêmeas), mostram diferenças referente ao tamanho das asas (Tab. 5 e 6).

Tabela 5. Resumo da análise de tamanho do centroide pela ANOVA de Procrustes entre machos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.

Tamanho do centroide	SQ	QM	GL	F	P
Espécies	69816,978260	9973,854037	7	7,84	<0,0001
Residual	86468,970247	1271,602504	68		

Tabela 6. Resumo da análise de tamanho do centroide por ANOVA entre fêmeas de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.

Tamanho do centroide	SQ	QM	GL	F	P
Espécies	112966,177992	16138,025427	7	8,23	<0,0001
Residual	115659,379995	1960,328474	59		

As variações das formas (*shape*) alares foram avaliadas por ANOVA de Procrustes, (Tabs.7 e 8), nota-se valores estatisticamente significantes atestando as variações das conformações das asas entre as espécies.

Tabela 7. Resumo da análise de conformação pela ANOVA de Procrustes entre machos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.

Forma, ANOVA de Procrustes	SQ	QM	GL	F	P
Espécies	0,02973376	0,0003034057	98	5,02	<0,0001
Residual	0,05749254	0,0000603913	952		

Tabela 8. Resumo da análise de conformação pela ANOVA de Procrustes entre fêmeas de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). SQ soma de quadrados, QM quadrados médios e GL graus de liberdade.

Forma, ANOVA de Procrustes	SQ	QM	GL	F	P
Espécies	0,02471005	0,0002941672	84	3,36	<0,0001
Residual	0,06195994	0,0000875140	708		

As análises de variáveis canônicas (CVA) forneceram sete variáveis canônicas que explicam 100% das variações entre as espécies (Tabs. 9 e 10).

Tabela 9. Resumo das Análises de Variáveis Canônicas entre machos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). Nota-se que as variáveis CV1 e CV2 explicam maior parte das variações.

Variável Canônica	% de Variância	% de Variância Acumulada
CV1	39,526	39,526
CV2	25,345	64,871
CV3	16,246	81,117
CV4	8,450	89,567
CV5	5,527	95,094
CV6	3,818	98,912
CV7	1,088	100,000

Tabela 10. Resumo das Análises de Variáveis Canônicas entre fêmeas de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). Nota-se que as variáveis CV1 e CV2 explicam maior parte das variações.

Variável Canônica	% de Variância	% de Variância Acumulada
CV1	42,966	42,966
CV2	22,073	65,040
CV3	13,809	78,849
CV4	9,125	87,974
CV5	7,009	94,983
CV6	3,913	98,896
CV7	1,104	100,000

Por meio das projeções gráficas resultantes das variáveis canônicas 1 e 2 obteve-se agrupamentos, as definições ficaram claras em ambos os sexos e possibilitaram a diferenciação, notou-se sete elipses resultantes de indivíduos do mesmo grupo (Figs. 16 e 17).

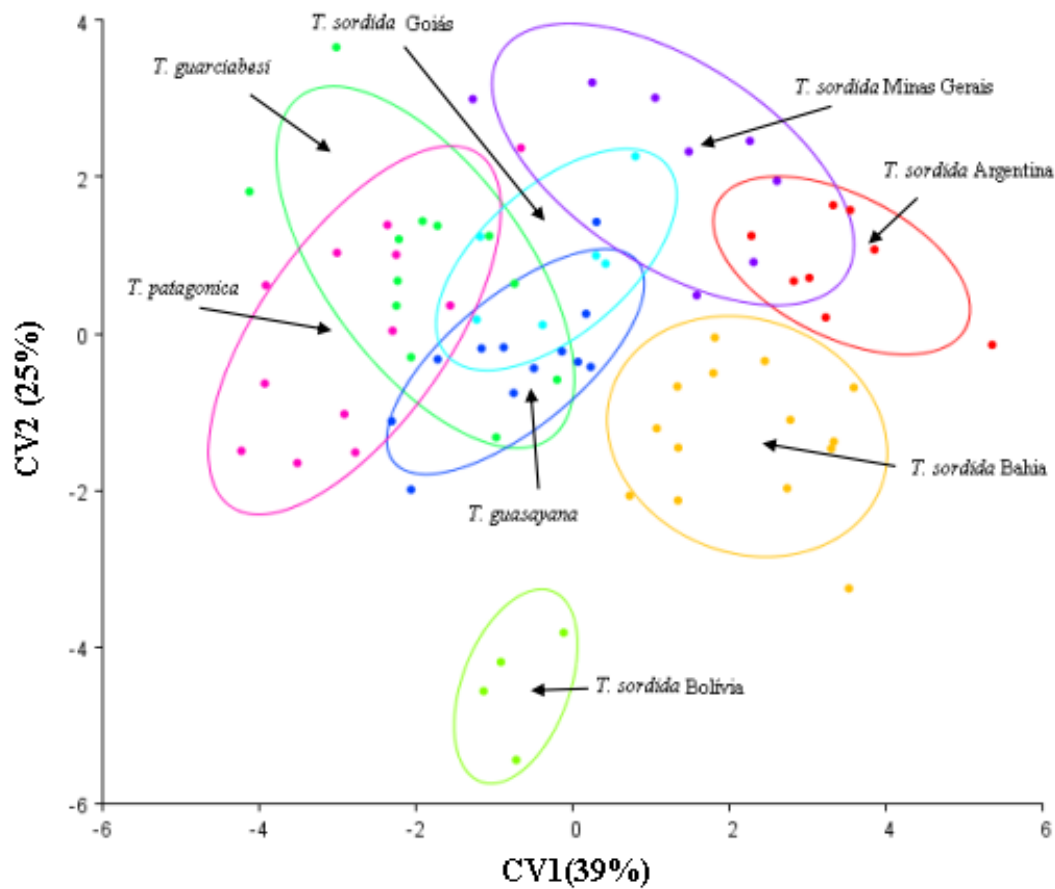


Figura 16. Diagrama de dispersão em relação à análise de dois fatores de variação de forma alares CV1 e CV2, entre machos. *T. garciabesi* (elipse verde), *T. guasayana* (elipse azul escuro), *T. patagonica* (elipse rosa) e *T. sordida* Bahia (elipse amarela), *T. sordida* Goiás (elipse azul claro), *T. sordida* Minas Gerais (elipse roxo), *T. sordida* Argentina (elipse vermelho) *T. sordida* Bolívia (elipse verde claro).

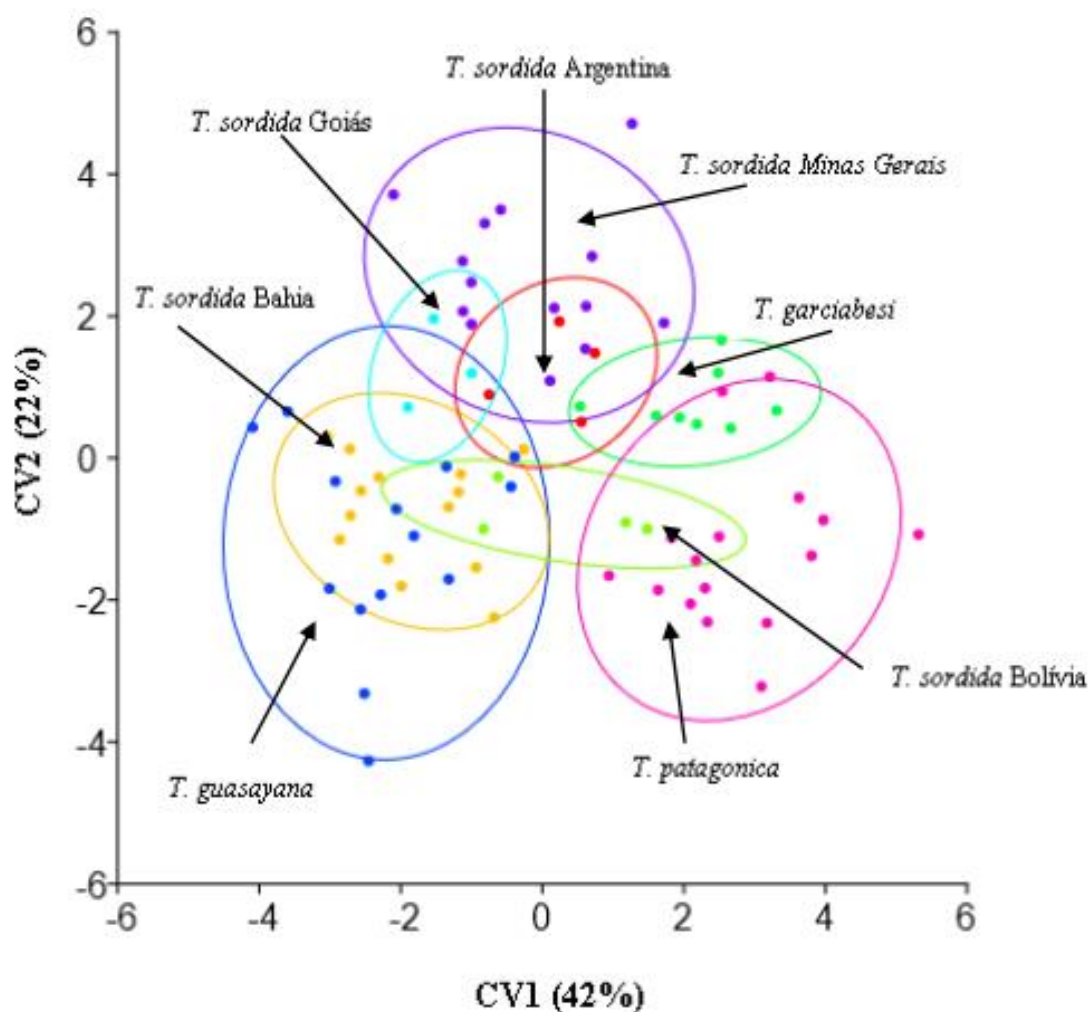


Figura 17. Diagrama de dispersão em relação à análise de dois fatores de variação de forma das asas CV1 e CV2, entre fêmeas. *T. garciabesi* (elipse verde), *T. guasayana* (elipse azul escuro), *T. patagonica* (elipse rosa) e *T. sordida* Bahia (elipse amarela), *T. sordida* Goiás (elipse azul claro), *T. sordida* Minas Gerais (elipse roxo), *T. sordida* Argentina (elipse vermelho) *T. sordida* Bolívia (elipse verde claro).

Para visualizar os eixos que diferenciam cada espécie nas projeções cartesianas, apresenta-se as grades de deformações obtidas da CV1 (Figs.18 A e B). As variáveis 4,6,7 e 8 foram as que apresentaram maiores alterações entre os machos, entre as fêmeas as variáveis 1,2,3,6, e 9 foram as que mais contribuíram para a discriminação entre as populações.

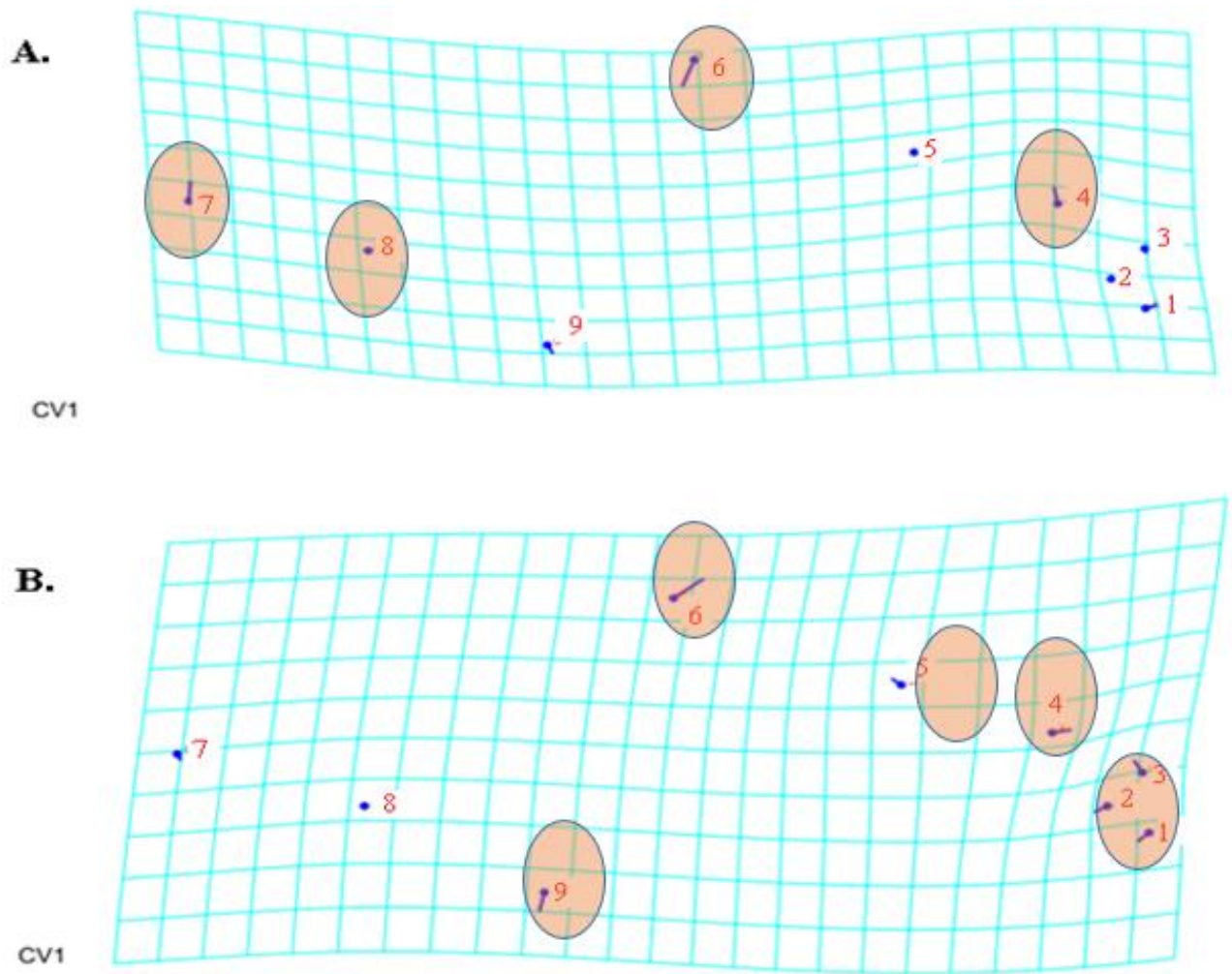


Figura 18. Diagrama de deformação derivado do CV1 resultante da comparação entre as asas de machos (A) e fêmeas (B) de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Minas Gerais). Os vetores indicam as direções das deformações. As elipses representam os eixos que mais diferenciam entre as amostras estudadas.

4.3.2 Variabilidades de forma entre as asas das espécies.

Os estudos das variações das formas alares foram realizados por meio da análise dos componentes principais (ACPs). Os resultados mostram variabilidade de formas das asas das espécies, juntos os componentes principais 1 e 2 explicam aproximadamente 48% das variações total das asas dos machos e 59% das variações nas fêmeas, permitindo a distinção entre as espécies a longo dos eixos.

Diferenças entre as espécies bem com ente machos e fêmeas, indicando a presença de dimorfismo. As diferenças entre machos e fêmeas podem serem percebidas por meio da distribuição dos dados no plano cartesiano PC1 (Figs. 19 e 20)

Os valores dos componentes principais (PC) indicam variabilidade de forma entre as asas das populações, nota-se que os valores estão dispersos entre os valores positivos e negativos, corroborando as inferências sobre as variações das formas alares (Figs. 19 e 20).

Os dados dispersos pelo componente principal 1 (PC1) relaciona-se a variabilidade do comprimento da asa esquerda, perceber-se que para os dois sexos os espécimes apresentaram valores positivos, assim infere-se que o fator tamanho contribui relativamente para diferenciação entre os espécimes estudados.

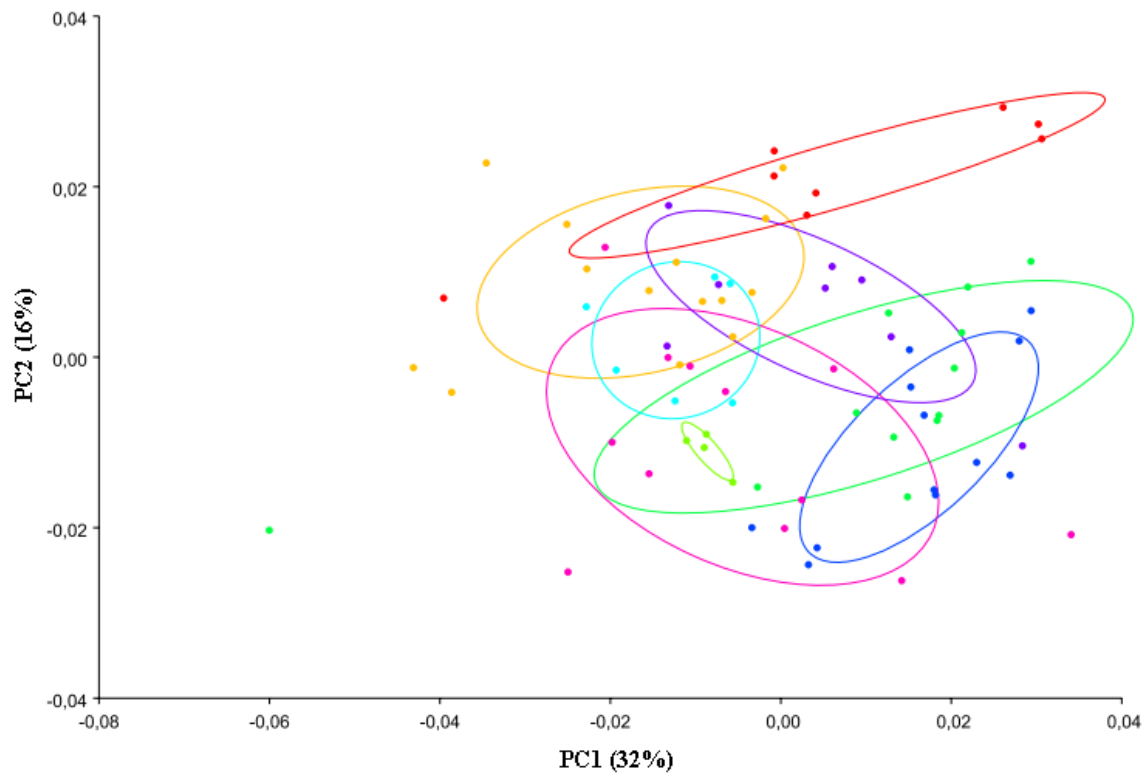


Figura 19. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das asas esquerdas de machos em relação à Análise dos Componentes Principais. Os eixos representam os componentes principais 1 e 2 derivados da análise das deformações parciais *T. garciabesi* (elipse verde), *T. guasayana* (elipse azul escuro), *T. patagonica* (elipse rosa) e *T. sordida* Bahia (elipse amarela), *T. sordida* Goiás (elipse azul claro), *T. sordida* Minas Gerais (elipse roxo), *T. sordida* Argentina (elipse vermelho) *T. sordida* Bolívia (elipse verde claro).

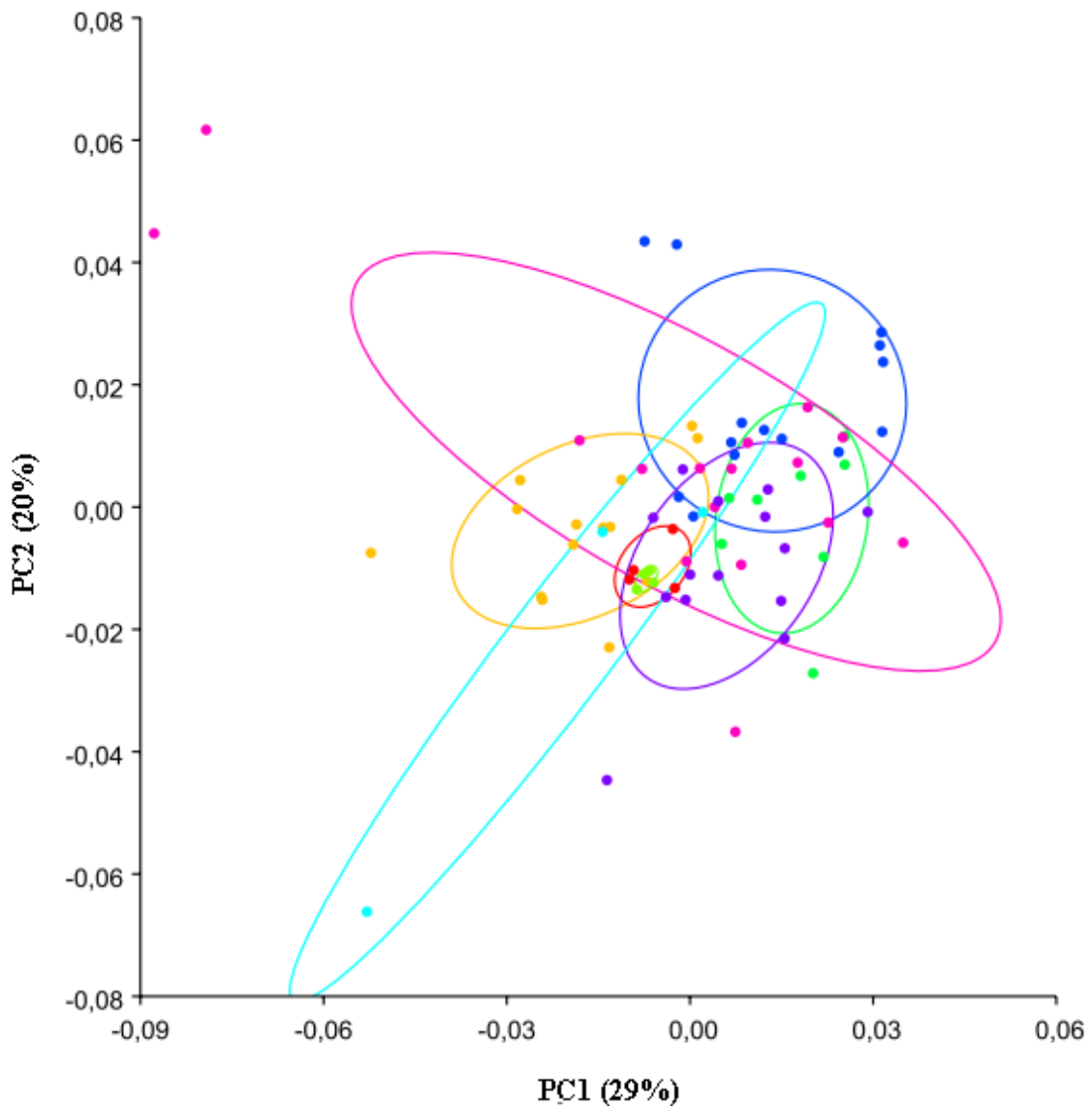


Figura 20. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das asas esquerdas das fêmeas em relação à Análise dos Componentes Principais. Os eixos representam os componentes principais 1 e 2 derivados da análise das deformações parciais. *T. garciabesi* (elipse verde), *T. quasayana* (elipse azul escuro), *T. patagonica* (elipse rosa) e *T. sordida* Bahia (elipse amarela), *T. sordida* Goiás (elipse azul claro), *T. sordida* Minas Gerais (elipse roxo), *T. sordida* Argentina (elipse vermelho) *T. sordida* Bolívia (elipse verde claro).

4.3.3 A separação dos grupos é bem definida?

As análises de discriminação entre as espécies foram realizadas por meio dos valores das distâncias de Mahalanobis. Os valores das probabilidades baixos para cada combinação indicam que as separações dos grupos possuem poucas chances de terem ocorrido ao acaso.

Pode-se observar a distância entre as espécies nos fenogramas de similaridade morfológicas construídos com base nas distâncias de Mahalanobis resultantes das análises discriminantes, construídos a partir dos valores estimados para os espécimes (Fig. 21). Pode-se notar que, por meio dos valores estimados, temos dois clados distintos, o primeiro onde encontra-se os espécimes de *T. sordida* provenientes da Argentina, Brasil (Bahia, Goiás, Mina Gerais) o segundo clado observa-se *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* proveniente da Bolívia.

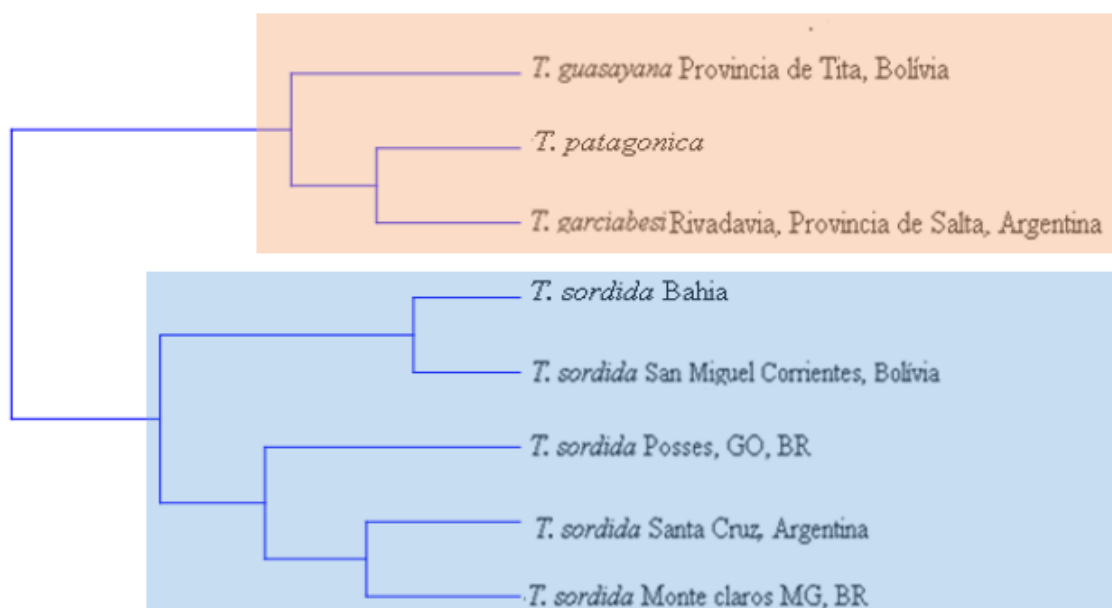


Figura 21. Fenograma de similaridade morfológica gerado por meio dos valores da distância Mahalanobis obtidas na análise discriminantes. *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica*, *T. sordida* provenientes da Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Goiás, Mina Gerais). O fenograma representa o resultado para os dois sexos.

4.4. Estudos moleculares.

4.4.1 Extrações do DNA genômico.

O DNA genômico foi extraído de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. sordida* provenientes da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Argentina e Bolívia, segundo protocolo modificado de Bargues & Mas-Comas (1997). A extração foi verificada em gel de agarose a 1%, onde foi possível verificar a qualidade e a integridade do DNA gênomico (Fig. 22).

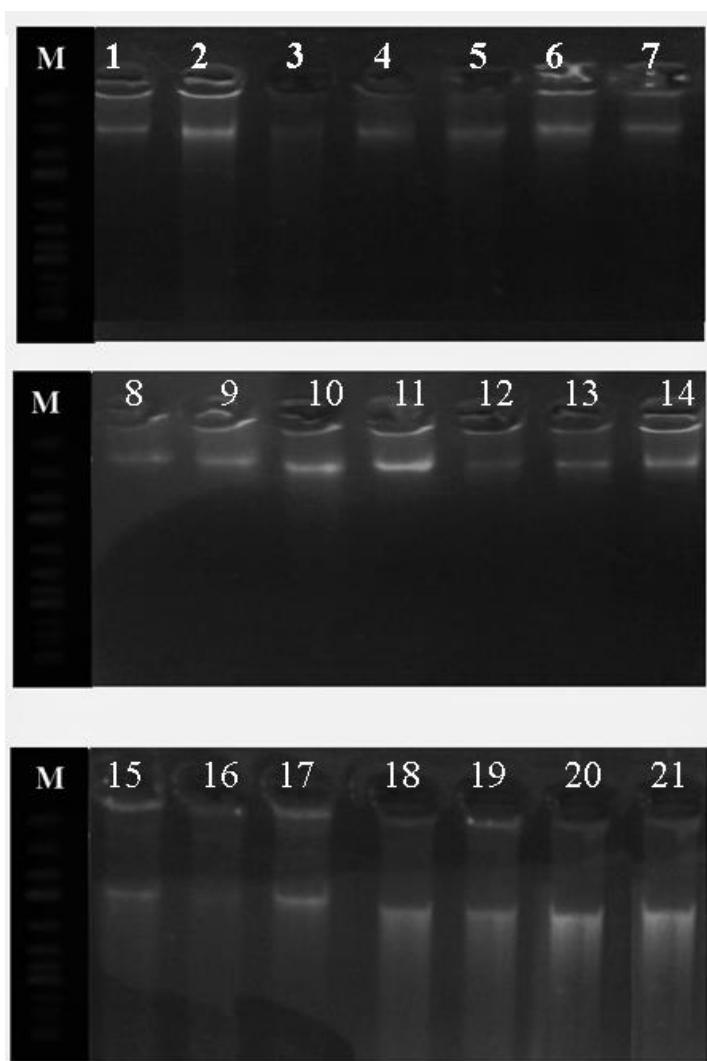


Figura 22. DNA genômico visualizado em gel de agarose a 1%. M, marcador molecular. 1, 2 e 3 *T. garciabesi*; 4, 5 e 6 *T. guasayana*; 7, 8 e 9 *T. sordida* Bahia, Brasil; 10, 11 e 12 *T. sordida* Goiás, Brasil; 13, 14 e 15 *T. sordida* Minas Gerais, Brasil; 16, 17 e 18 *T. sordida* Bolívia e 19, 20 e 21 *T. sordida* Argentina.

4.4.2 Sequenciamento dos genes.

Foram sequenciados os segmentos dos genes CO1, *Cyt b*, 28S, as sequências dos genes 16S foram obtidas no banco de dados *GenBank*[®]. Os genes ITS1 e ITS2 não foram utilizados para o estudo, por mais que houve sucesso nas amplificações as sequências não estavam adequadas para as análises subsequentes, apresentavam-se fragmentadas impossibilitando as análises filogenéticas. Portanto, foram estudados 4 genes.

Os dados referentes aos insetos utilizados nos estudos filogenéticos e os respectivos genes estão sumarizados na Tab. 14, inclusos as sequências obtidas no banco de dados *GenBank*[®] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 14. Triatomíneos usados no estudo, sequências obtidas dos genes CO1, *Cyt b*, 28S e 16S, origem, e código de acesso [ao GenBank®](#).

Espécies	Origem	CO1	<i>Cyt b</i>	28S	16S
<i>T. sordida</i>	Seabra, BA, Brasil	---	*	*	---
<i>T. sordida</i>	Posses, GO, Brasil	*	---	*	---
<i>T. sordida</i>	Monte Azul, MG, Brasil	*	---	*	---
<i>T. sordida</i>	Pantanal, MS, Brasil	KC249384	KC249292	KC24921	KC249075
<i>T. sordida</i>	Santa Cruz, Argentina	*	*	*	KC249076
<i>T. sordida</i>	San Miguel Corrientes, Bolívia	*	*	*	KC249078
<i>T. garciabesi</i>	Rivadavia, Salta, Argentina	*	*	*	KC249006
<i>T. quasayana</i>	Província de Tita, Bolívia	*	*	*	KC249010
<i>T. patagonica</i>	s/dados	---	---	---	AY035464
<i>T. rubrovaria</i>	Canguçu, RS, Brasil	KC249373	KC249281	KC249202	KC249064
<i>R. brethesi</i>	Acará River, AM, Brasil	KC249313	KC249235	---	KC24898
<i>R. prolixus</i>	s/dados	---	---	AF435862	---

* genes sequenciados, --- não analisado.

4.4.3 Gene CO1 mtDNA.

Obteve-se sequências do gene mitocondrial CO1 de três amostras referentes a espécies: *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* Seabra, BA, Brasil, *T. sordida* Posses, GO, Brasil, *T. sordida* Monte Azul, MG, Brasil, *T. sordida* Santa Cruz, Argentina e *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia. *T. rubrovaria* Canguçu e RS, Brasil, e *R. brethesi* Acará River, AM, Brasil como grupo externo. Pós alinhamento e correção obteve-se uma matriz de 650pb para análise de máxima verossimilhança (ML) baseadas no modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980), testadas utilizando o método de *bootstrap* com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985) com auxílio do programa *MEGA* v7.0 14.

O percentual médio de nucleotídeos para este gene foi de Adenina (A) 25%, Timina (T) 25%, Citosina (C) 25% e Guanina (G) 25%. A proporção de transição / transverso estimado (R) é de 0,59, a distância média entre as sequências foi de 1.737, estimadas por modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A árvore consenso foi obtida usando como grupo externo *T. rubrovaria* e *R. brethesi* (Fig. 23).

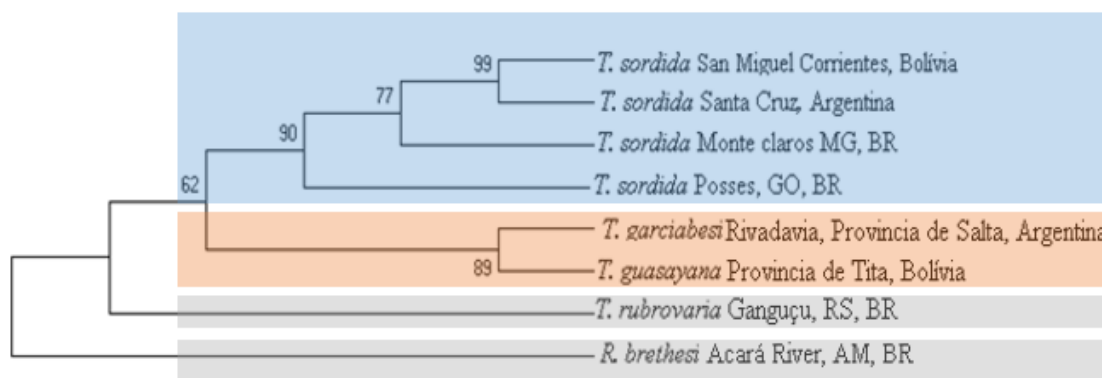


Figura 23. Árvore consenso de ML para o gene COI. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* Monte Claros, MG, BR; *T. sordida* Posses, GO, BR; *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia; *T. sordida* Santa Cruz, Argentina. *T. rubrovaria* Canguçu e RS, Brasil, e *R. brethesi* Acará River, AM, Brasil como grupo externo.

4.4.4 Gene *Cyt b* mtDNA.

Foram obtidas sequências do gene mitocondrial *Cyt b* *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* Seabra, BA, Brasil, *T. sordida* Pantanal, MS, Brasil; *T. sordida* Santa Cruz, Argentina e *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia. Alinhadas e corrigidas manualmente obteve-se um consenso de 549pb para análise de máxima verossimilhança (ML), baseadas no modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980), testadas utilizando o método de *bootstrap* com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985) com auxílio do programa *MEGA* v7.0 14.

A média de nucleotídeos foi de Adenina (A) 25%, Timina (T) 25%, Citosina (C) 25% e Guanina (G) 25%. Para os valores de transição / transversão estimou-se (R) é de 0,32, a distância média entre as seqüências foi de 0.111, calculada pelo modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A árvore consenso foi obtida usando como grupo externo *T. rubrovaria* e *R. brethesi* (Fig. 24).

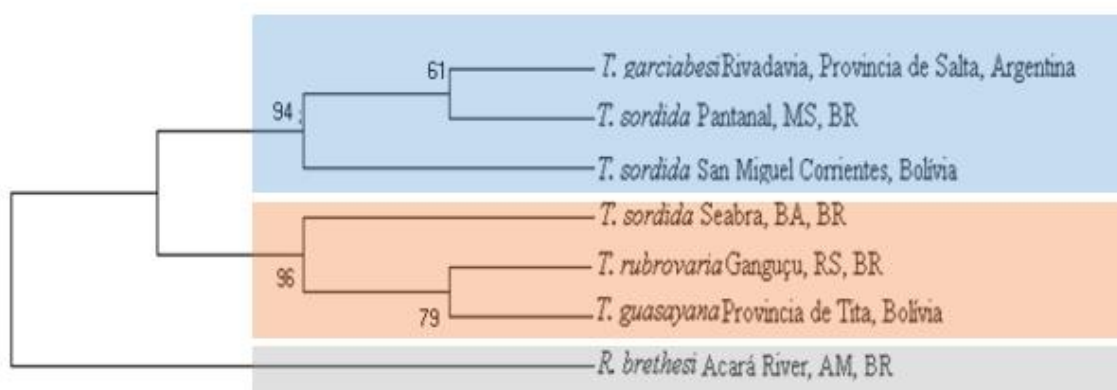


Figura 24. Árvore consenso de ML para o gene *Cyt b*. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* Seabra, BA, BR; *T. sordida* Pantanal, MS, BR; *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia; *T. sordida* Santa Cruz, Argentina. *T. rubrovaria* Ganguçu e RS, Brasil, e *R. brethesi* Acará River, AM, Brasil como grupo externo.

4.4.5 Gene 16S rDNA.

As sequências analisadas para o gene 16S foram adquiridas da plataforma *GenBank*® (ver tab. 14). Para estabelecer uma ligação com os outros genes escolheu-se seguindo o critério da localidade da população estudada. A sequências obtidas foram formatadas no programa *Bioedit* v7.25 (HALL, 1999) as sequências consenso correspondem a matrizes de 542pb analisadas por máxima verossimilhança (L) segundo modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980) testados por meio de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) com auxílio do programa *MEGA* v7.0 14.

A média de nucleotídeos foi de Adenina (A) 25%, Timina (T) 25%, Citosina (C) 25% e Guanina (G) 25%. A proporção de transição / transversão estimado (R) é de 1,61, à distancia média entre as sequências foi de 0,088. A árvore consenso foi obtida usando como grupo externo *T. rubrovaria* e *R. brethesi* (Fig. 26).

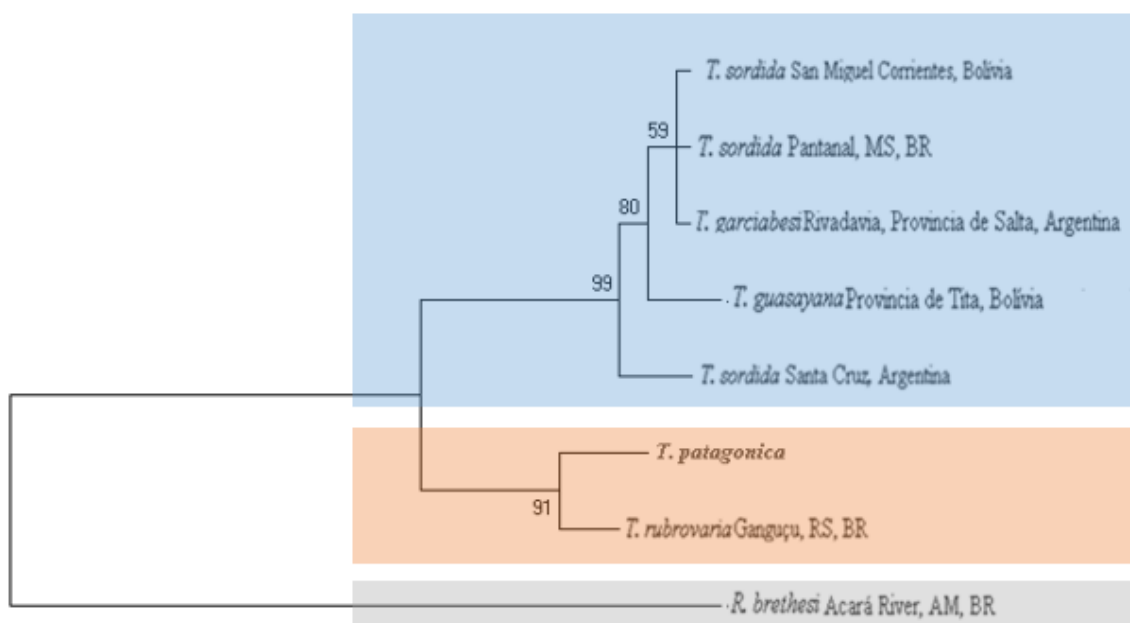


Figura 25. Árvore consenso de ML para o gene 16S. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia; *T. sordida* Santa Cruz, Argentina. *T. rubrovaria* Ganguçu RS, BR e *R. brethesi* Acará River, AM, Brasil como grupo externo.

4.4.6 Gene 28S rDNA.

Obteve-se sequências do gene 28S de *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* Seabra, BA, BR; *T. sordida* Monte Claros, MG, BR; *T. sordida* Posses, GO, BR; *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia; *T. sordida* Santa Cruz, Argentina. *T. rubrovaria* Canguçu RS, Brasil, e *R. prolixus*, sem dados de origem. Os consensos analisados por máxima verossimilhança (ML), baseadas no modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura, 1980), alinhados e corrigidos resultaram em matrizes de 594pb, utilizando o método de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) com auxílio do programa MEGA v7.0 14.

A média de nucleotídeos foi de Adenina (A) 25%, Timina (T) 25%, Citosina (C) 25% e Guanina (G) 25%. A proporção de transição / transverso estimado (R) é de 0,35, a distância média entre as seqüências foi de 0.485. A árvore consenso foi obtida usando como grupo externo *T. rubrovaria* e *R. prolixus* (Fig. 25).

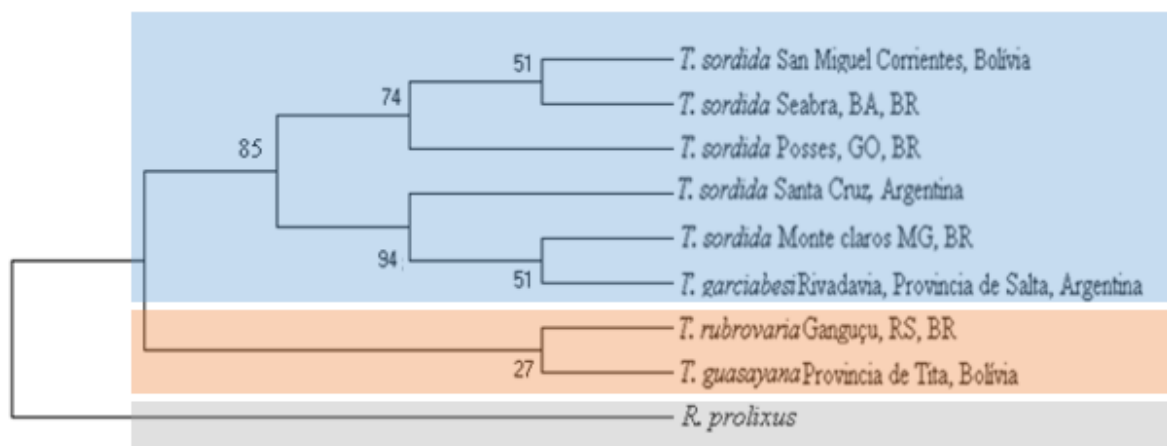


Figura 26. Árvore consenso de ML para o gene 28S. Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina, *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia, *T. sordida* Seabra, BA, BR; *T. sordida* Monte Claros, MG, BR; *T. sordida* Posses, GO, BR; *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia; *T. sordida* Santa Cruz, Argentina. *T. rubrovaria* Canguçu RS, BR e *R. prolixus* como grupo externo.

4.4.7 Inferência Bayesiana.

O consenso da análise Bayesiana (burnin=25%) geradas por meio da concatenação dos genes CO1, *Cyt b*, 16S e 28S sequenciados de *T. garciabesi* Rivadavia, Província de Salta, Argentina + *T. guasayana* Província de Tita, Bolívia + *T. patagonica* + *T. sordida* Seabra, BA, Brasil + *T. sordida* Pantanal, MS, BR+ *T. sordida* Santa Cruz + Argentina e *T. sordida* San Miguel Corrientes, Bolívia + *T. rubrovaria* Canguçu RS, Brasil e *R. brethesi* Acará River, AM, BR.

A inferência bayesiana possibilitou discriminar as populações em clados, pode-se visualizar de forma clara no filograma a variabilidade genética presente no subcomplexo *T. sordida*. As inferências das relações filogenéticas aqui apresentadas são consistentes, devido ao suporte dado pelos elevados valores de *bootstrap* e revisão literária (Fig. 27).

Pode-se observar clados bem definidos, as populações de *T. sordida* (Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Pantanal) compõem um clado único (clado azul, BPP=100%, Fig. 27) logo temos um clado formado por *T. garciabesi* e *T. guasayana* (clado laranja, BPP= 99,98%, Fig. 27), a espécie *T. patagonica* divergiu das outras espécies subcomplexo ficando mais próximo de *T. rubrovaria* (clado rosa, BPP= 99,61%, Fig. 27).

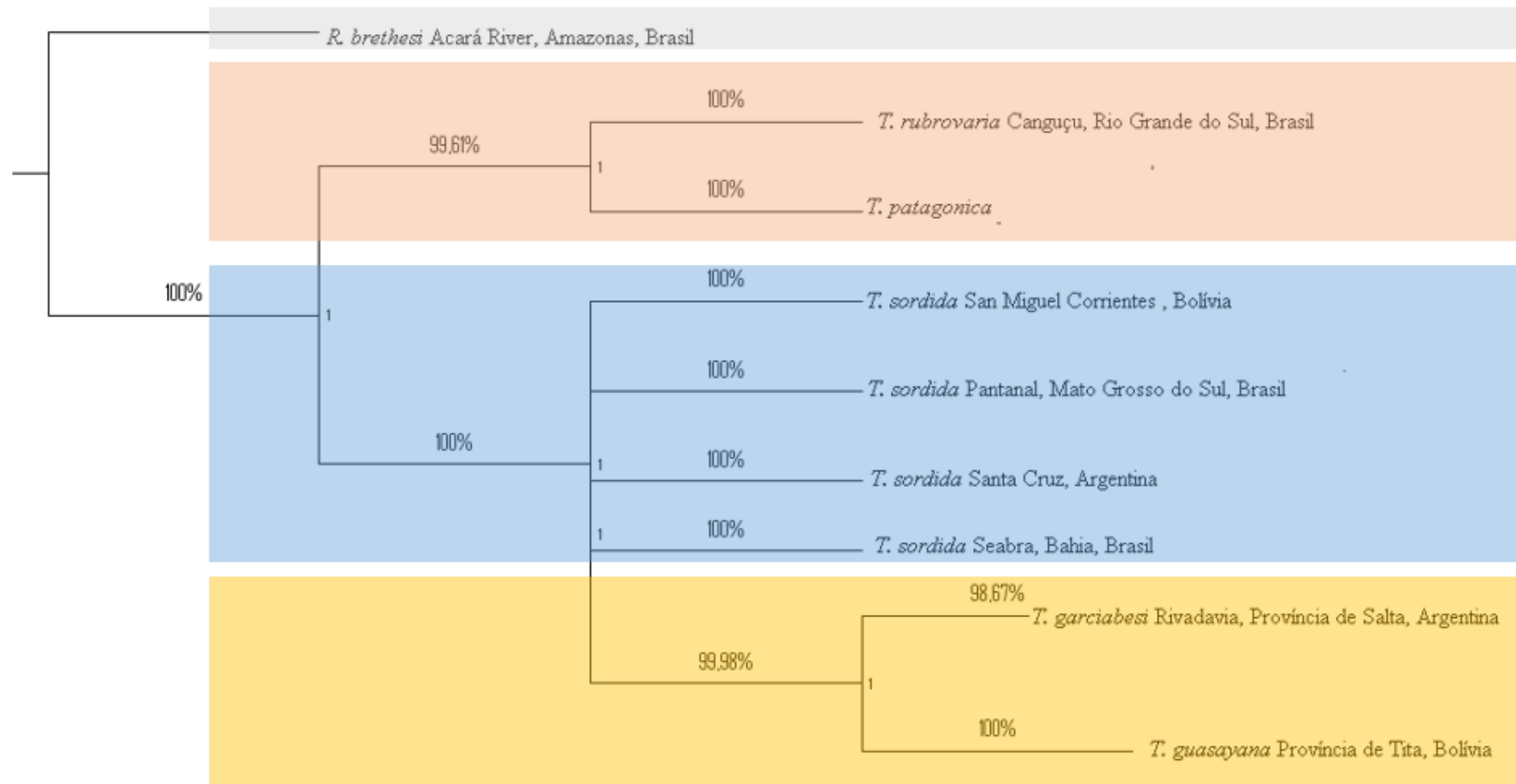


Figura 27. Filograma consenso da inferência Bayesiana entre os genes CO1, Cyt *b*, 16S e 28S concatenados. Clado laranja *T. garciabesi*, *T. guasayana*, clado rosa *T. patagonica* e *T. rubrovaria*, clado azul *T. sordida* Argentina, Bolívia, Brasil (Bahia, Pantanal), e *R. brethesi* clado cinza. Modelo de evolução segundo critério Akaike GTR + G.

4.5 Resultados dos estudos filogenéticos.

As características diferenciais e não diferenciais obtidas dos estudos morfológicos, morfométricos e moleculares estão listadas na tabela 15.

Tabela 15. Características diferenciais e não diferenciais entre *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*.

Parâmetro	<i>T. garciabesi</i>	<i>T. guasayana</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>
Processo mediano do pigóforo	-	-	-	-
Genitália externa feminina – ventral	+	+	+	+
Genitália externa feminina – posterior	+	+	+	+
Genitália externa feminina – dorsal	+	+	+	+
Morfologia de ovos.	-	-	-	-
Histologia de ovos	+	+	+	+
Morfometria de ovos – comprimento	+	+	+	+
Morfometria de ovos – largura	-	-	-	-
Morfometria de ovos – perímetro da abertura opercular	+	+	+	+
Morfometria geométrica	+	+	+	+
Estudo molecular – gene CO1	+	+	+	+
Estudo molecular – gene <i>Cyt b</i>	+	+	+	+
Estudo molecular – gene 28S	+	+	+	+
Estudo molecular – gene 16S	+	+	+	+
Inferência Bayesiana	+	+	+	+

+ parâmetro discriminatório

– parâmetro não discriminatório

5. DISCUSSÃO.

A relações filogenéticas entre os triatomíneos são constantemente revisadas, pois novas propostas surgem com objetivo de melhorar a compreensão a respeito da historia evolutiva desses vetores e sua relação com *T. cruzi* e seus hospedeiros. Assim sendo, assumindo a importância da caracterização específica para o planejamento de medidas de controle, objetivou-se neste trabalho discutir as relações sistemáticas de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* por meio de abordagens morfológicas, morfométricas e moleculares.

A filogenia da subfamília Triatominae é amparada em estudos morfológicos, morfométricos e maximizada pela biologia molecular, a concatenação entre as metodologias proporciona, de certa forma, uma visão integral dos fenômenos biológicos, consequentemente podem oferecer ferramentas para desenvolvimento de ações relacionadas ao controle e vigilância epidemiológica.

Por meio do estudo morfológico da genitália masculina de *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T. sordida*, descreveu-se a arquitetura do processo mediano do pigóforo (PrP). As observações corroboram as descrições anteriores, bem como apresenta-se uma nova abordagem metodológica para as espécies estudadas.

As peças fálicas de triatomíneos possuem caracteres distintivos, por este proposito, são úteis para estudos taxonômicos, segundo Galvão (2014) os primeiros estudos que exploraram caracteres da genitália masculina foram por meio das descrições dos parâmeros e do processo mediano do pigóforo, nominados primeiramente por Pinto (1926) como “ganchos” e “espinhos” respectivamente. Lent & Jurberg (1965) contrastando as peças fálicas de espécies do gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, mostram que o caractere é útil para diagnose específica entre espécies próximas.

De acordo com Lent & Wygodzinky (1969) o pigóforo é uma estrutura vigorosamente quitinizada e suas características são úteis para estudos taxonômicos, como, por exemplo, a projeção posterior denominada como processo mediano do pigóforo (PrP). Entre as espécies do subcomplexo *T. sordida* as peças fálicas apresentam pouca variabilidade, Gorla *et al* (1993) estudando comparativamente *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*,

indicam haver pouca variabilidade nas peças fálicas, apresentando algumas diferenças no PrP, como a forma levemente arredondada em *T. sordida*.

Os resultados indicam haver pequenas diferenças entre os PrP das espécies estudadas, por este propósito, não foi possível diferenciar as espécies pelas imagens obtidas por MEV, as descrições aqui apresentadas estão de acordo com as encontradas na literatura, de acordo com Jurberg *et al* (1998) os aspectos das peças fálicas do gênero *Triatoma* são relativamente similares, o mesmo não se percebe em outros gêneros, como demonstrado por Rosa *et al* (2012) na descrição de uma nova espécie do gênero *Rhodnius*.

T. guasayana, *T. garciabesi* apresentam maior similaridade entre as espécies estudadas. Para *T. sordida* considerou-se a distribuição da espécie e por meio de populações distintas da Argentina, Bolívia e Brasil não foi possível observar diferenças significativas.

As genitálias externas femininas de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* foram investigadas por meio de microscopia de luz e MEV, a metodologia utilizada possibilitou descrever e diferenciar as espécies estudadas.

A genitália externa feminina é útil em estudos taxonômicos entre gêneros (Rosa *et al*, 2010) e a espécies (ROSA *et al*, 2012, 2014). Lent & Juberger (1965) em estudo com o gênero *Psamolestes* (BERGROTH, 1911), dispuseram das características da genitália feminina para discriminação entre as espécies do gênero. Mais recentemente, Bérenger & Pluot-Sigwalt (2002), apresentam o primeiro relato de fêmeas da espécie *R. amazonicus* e utilizam entre outras técnicas a genitália feminina externa na revalidação da espécie anteriormente sinonimizada com *R. pictipes* por Lent & Wygodzinsky, 1979. Os avanços atribuídos a novas tecnologias que envolvem técnicas de microscopia, contribuem para melhorias das descrições taxonômicas (ROSA *et al*, 2010, 2014; MENDONÇA *et al*, 2016;). Abalos & Wygodzinsky (1951), citam aspectos das genitálias femininas de algumas espécies de Triatominae, por meio de microscopia de luz, os autores apresentam considerações a respeito da genitália, como a variabilidade percebida em algumas espécies, como, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida*, dentre outras

Os resultados dos estudos da genitália externa feminina estabelecem um novo caráter discriminatório para o subcomplexo *T. sordida*. Por meio de MEV notam-se diferenças evidentes em todas as posições verificadas, principalmente entre *T. garciabesi* e *T.*

sordida que exigem uma maior atenção foram facilmente caracterizadas. As diferenças encontradas em todos segmentos abdominais são observadas em todas as espécies, notam-se diferenças na forma e tamanho.

Os aspectos morfológicos dos ovos possuem singularidades que auxiliam na caracterização específica (GALLIARD, 1935; BARATA, 1981, 1993; ROSA et al, 2000; OBARA et al, 2007; GALVÃO, 2014;). Os primeiros estudos comparativos com ovos foram propostos por Galliard (1935) que estudou a ultraestrutura de ovos de algumas espécies. Barata (1981) por meio de microscopia (ML e MEV) estudou ovos de dez espécies do gênero *Rhodnius*, diferenciando-as pelas características morfológicas e morfométricas. Este estudo analisou exocórios de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* pelo ponto de vista morfológico, morfométrico e histológico.

As quatro espécies apresentaram semelhanças exocoriais, pontualmente *T. patagonica* e *T. sordida* apresentam forma mais alongada quando confrontadas com *T. guasayana* e *T. garciabesi*. As células exocoriais apresentam poucas diferenças, as formas poligonais verificadas pelas imagens obtidas por MEV são respectivamente semelhantes com leves diferenças em sua organização, ao contrario do que se percebe em *T. patagonica*, ou seja, o exocório levemente simétrico em suas formas, as demais espécies não estabelecem tal padrão, um outro ponto, são as diferenças nas linhas limitantes, característica marcante em *T. guasayana* que se apresenta sulcada. Os resultados deste estudo corroboram as descrições anteriores dos exocórios (ABALOS & WYGODZINSKY, 1951; BARATA, 1998; VISCIARELLI et al, 2004).

O perfil das células exocoriais dos ovos verificados por MEV não foram úteis para a diagnose específica, sugere-se a aplicação de outras metodologias para avaliar o padrão de significância, caso ele exista, considerando que as imagens obtidas não revelam diferenças marcantes.

Os estudos histológicos por meio de cortes nos ovos das quatro espécies do subcomplexo *T. sordida* foram realizados de acordo com metodologia proposta por Obara et al (2007). As observações por meio de ML auxiliaram nas descrições, pode-se perceber ao analisar as imagens a presença de quatro camadas celulares. Em termos gerais as principais características são percebidas na membrana interna do exocório, *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T. sordida* apresentou pequenas ondulações pouco visíveis pelas imagens, *T. patagonica*

apresenta um perfil liso. Outro ponto forte para discriminação das amostras, foram as diferenças nas espessuras dos exocórios e o padrão de assimilação dos corantes, tal fator, possivelmente relaciona-se a composição celular ou ao menos a deposição de camadas celulares.

As variabilidades morfométricas foram investigadas por morfometria clássica, comparou-se por meio dos valores médios e desvios padrões as variáveis de comprimento, largura e perímetro da abertura opercular dos exocórios. O comprimento médio foi estatisticamente significativo, *T. patagonica* apresentou as maiores dimensões, *T. garciabesi* e *T. sordida* apresentaram valores médios aproximados. As avaliações referentes a largura não foram significantes para diferenciar as espécies. O perímetro da abertura opercular avaliado mostra valores estatisticamente significantes entre as quatro espécies.

De acordo com Abalos & Wygodzinsky (1951) a arquitetura dos ovos de ovos de *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* são similares, principalmente o aspecto microscópico do exocório. Barata (1998) em considerações sobre o exocório de algumas espécies do gênero *Triatoma*, cita em suas discussões a similaridade percebida na ultraestrutura do exocório de algumas espécies, mas ressalta a variabilidade morfométrica presente no gênero. Podemos observar por meio dos resultados, em termos gerais, os ovos de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e *T. sordida* apresentam caracteres úteis para a diagnose específica.

A análise das formas e tamanhos alares de *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica* e populações de *T. sordida* provenientes dos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais e Argentina e Bolívia, indicam diferenças no tamanho e na forma. Percebe-se que a conformação das asas das espécies estudadas são similares, entretanto, por meio de morfometria geométrica foi possível atestar a variabilidade em populações de localidades diferentes de *T. sordida*. As populações de *T. sordida* apresentam a maior média de tamanho do centroide, valor referente ao tamanho das asas. Dentro do subcomplexo *T. sordida* as asas possuem tamanho e forma diferentes, bem como foi verificado um consistente dimorfismo sexual, as fêmeas com asas maiores. Os valores da ANOVA de Procrustes suportam essa variabilidade, uma vez que os índices de significância estatística foram elevados.

Por meio das variáveis canônicas foi possível explicar 100% das diferenciações entre os grupos *a priori*, as projeções dos eixos cartesianos mostram com clareza os agrupamentos

correspondentes as características de cada população. As grades de deformação mostram claramente a variabilidade de formas.

Por meio dos resultados dos componentes principais notamos a variabilidade na forma das asas, a distribuição pelo eixo positivo do gráfico mostra diferenças entre as espécies, principalmente referentes a variável tamanho, os resultados deste trabalho corroboram com os obtidos por Gurgel *et al* (2010).

Os estudos moleculares com as espécies do subcomplexo *T. sordida* e mais duas espécies externas, foram realizadas com os genes CO1, *Cyt b*, 16S e 28S. Os resultados mostram claramente as divergências na distribuição das espécies pelos filogramas, ou seja, por meio dos genes utilizados as espécies apresentam distanciamento genético. Os resultados das análises filogenéticas são coerentes com as características evolutivas esperadas para os genes estudados. Os genes mitocôndrias apresentaram maiores valores de *bootstrap*, quando comparados com o gene nuclear 28S, que apresentou menor eficácia para distinção entre espécies, fato esperado, assumindo a característica evolutiva deste marcador molecular.

As populações de *T. sordida* apresentam variabilidade genética, mas são relativamente próximas. Por meio do sequenciamento dos genes CO1, *Cytb* e 28S percebe-se que *T. guasayana* é distante das outras espécies do subcomplexo, Panzera *et al* (2015) discutem a distância de *T. guasayana* das demais espécies do subcomplexo e sua proximidade com *T. rubrovaria*, o mesmo pode-se perceber em nos resultados deste trabalho. *T. garciabesi* e as populações de *T. sordida* são próximas em todos os genes estudados, de acordo com Panzera *et al* (2015) por mais que existam diferenças genotípicas e fenotípicas entre as espécies é possível ainda encontrar espécimes identificados de forma errada, os resultados obtidos corroboram as informações a respeito de marcadores genéticos úteis para a diagnose específica, bem como oferece dados a respeito da divergência das espécies que compõem o subcomplexo.

Por meio da combinação dos genes mitocôndrias e nucleares foi possível gerar o filograma referente aos resultados da inferência bayesiana, por meio dos valores percebeu-se clados bem específicos, suportados pelos elevados valores de bootstrap.

Como já citado anteriormente o subcomplexo *T. sordida* claramente é um complexo de espécies crípticas, característico pela similaridade morfológica, as relações filogenéticas do

subcomplexo são frequentemente revistas, alguns autores sugeriram recentemente que na Argentina é possivelmente devida a um evento de especiação, o que levou aos autores sugerirem ao menos um táxon novo (PANZERA et al, 2015).

Pita et al (2016), sugere um novo agrupamento em alguns subcomplexos da subfamília Triatomine, os resultados obtidos corroboram essa sugestão, pois *T. guasayana* e *T. patagonica* estão associadas as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, como observado pelos resultados dos genes mitocondriais e nucleares. Essa proximidade também é discutida por outros autores (GARDIM et al, 2013, JUSTI et al, 2014). Por mais que, o filograma da inferência bayesiana tenha distanciado *T. guasayana* de *T. rubrovaria*, os resultados com os genes reforçam a hipótese da proximidade de *T. rubrovaria*. *Triatoma garciabesi* e *T. sordida* permanecem como espécies irmãs.

A caracterização específica de insetos vetores é importante, assim, é possível aprimorar a vigilância epidemiológica, consequentemente ampliar o conhecimento a respeito das relações filogenéticas dos Triatominae. Os resultados obtidos corroboram as descrições dessas espécies na literatura consultada, assim como agregam novos dados relacionados à filogênese do subcomplexo *T. sordida*.

6. CONCLUSÕES.

Por meio da combinação de dados morfológicos, morfométricos e moleculares pode-se maximizar o conhecimento a respeito das relações filogenéticas e taxonômicas do subcomplexo *T. sordida*.

Os estudos morfológicos da genitália externa feminina por MEV e do estudo histológico do exocório de ovos possibilitaram a identificação das quatro espécies do subcomplexo *T. sordida*.

O processo mediano do pigóforo e a morfologia do exocório por MEV não discriminaram as quatro espécies.

Os estudos morfométricos de ovos revelaram a variabilidade das quatro espécies.

A morfometria geométrica das asas foi útil para discriminação específica.

Os dados moleculares mostraram quais genes são úteis para caracterização específica, da mesma maneira que revela a divergência genética dentro do grupo.

Dadas as dificuldades de identificação específica das espécies do subcomplexo *T. sordida*, o presente trabalho contribui para diagnose específica e filogenia da subfamília Triatominae.

Apoio

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F; MONTEIRO, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An Acad Bras Ciênc.** v. 77, n.3, p.437-454, 2005.
- ABALOS J.W; WYGODZINSKY, P. Las Triatominae argentinas (Reduviidae, Hemiptera). Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina. 1951. n. 601, p.179. (Monograph N°. 2.)
- ACTIS, A.S; TRAVERSA, O.C, CARCAVALHO, R.U. Estudios taxonómicos sobre el genero *Triatoma* Laporte mediante la electrophoresis de la linfa. **An Esc Nac Cienc Biol.** v.13, n. 1-4, p. 97-106, 1964.
- ALEVI, K.C.C.; RAVAZI, A; MEDONÇA, V.J; ROSA; J.A; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Karyotype of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Triatominae). **Gen Mol Res**, v.14, n.1, p. 222-226, 2015.
- ALONSO-VEGA, C; BILLOT, C; TORRICO, F. Achievements and Challenges upon the Implementation of a Program for National Control of Control of Congenital Chagas in Bolivia: Results 2004-2009. **PLOS Negl Trop Dis.** v.7, n. 7, e2304. doi:10.1371/journal.pntd.00023042013.
- ANDRADRE, D.V; GOLLOB, J; WALDEREZ O. DUTRA. Acute Chagas disease: New global challenges for an old neglected disease. **PLOS Negl Trop Dis.** v.8. n.7, e3010. Jul 2014.
- ANEZ, N; CRISANTE, J; ROJAS, A; DÁVILA, D. Brote de enfermedad de Chagas agudo de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. **Bol Mal Salud Amb.** Maracay, v.53, n.1, Jan 2013.
- ARGUELLO, N.V; MARKARINI, R.M; CIVITTA, G.L; MISCHIS, C. Algunos parámetros poblacionales de *Triatoma guasayana* Wygodzinsky & Abalos, 1941, bajo condiciones de laboratorio (Reduviidae, Triatominae). **Rev Bras. Zool**, Curitiba, v.1, n.3, p. 169-175, 1982.

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

BARATA, J.M.S; ROSA, J.A; BARATA E.M.A; UBIRNATTI. Aspectos macroscópicos e exocoriais de ovos em oito gêneros da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Soc Bra. Med Trop.** v.26, Suppl 2, p.95-96, 1993.

BARATA, J.M.S. Macroscopic and exocorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). In: Carcavallo, R.U.; Galíndez-Girón, I.; Jurberg, J.; Lent, H. (eds.). **Atlas of Chagas disease vectors in the Americas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. v.2, p.409-448.

BARGUES, M.D; MARCILLA, A; DUJARDIN, J.P; MAS-COMA, S. Triatominae vectors of *Trypanosoma cruzi*, a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA makers. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, Supl. 1, p. S159-S164, 2002.

BÉRENGER, J.M; SIGWALT-PLUOT, D. *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973, Bona Species, Close to *R. pictipes* Stål, 1872 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Osw Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.1, p. 73-77, 2002.

BOOKSTEIN, F.L. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**. Cambridge: Camb Univ Press, 1991. 455 p.

CANALE, D.M; CECERE, M.C; CHUIT, R. Peridomestic distribution of *Triatoma garciabesi* and *Triatoma quasayana* in north-west Argentina. **Med. Vet. Entomol**, v.14, n.4, p. 383-390, 2000.

CARCAVALLO, R.U; CICHERO, J.A; MARTÍNEZ, A; PROSEN, A.F; RONDEROS, R. Una nueva especie Del género *Triatoma* Laporte (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Seg. Jorn. Entomoepidemiol. Argentinas, 2, p.43-48, 1967.

CARCAVALLO, R.U; JUSTUS, N.S; MARTÍNEZ, A.M. Descripción de las ninfas de II, III, y IV estadio de *Alberprosenia goyovargasi* Martínez & Carcavallo, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Observaciones con microscopia eletrônica de barrido. **Bol Dir Malariol San Amb.** v.18, p.131-132, 1978.

CARCAVALLO, R.U; JURBERG, J. *T. baratai* sp.n. do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol Vectors**. v. 7, p. 373-387, 2000.

CARCAVALLO, R.U; JURBERG, J; LENT, H; NOIREAU, F; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomol Vectors**. v. 7, Suppl. 1, p. 1–99, 2000.

CATALÁ, S.S; CROCCO, L.B; MUÑOZ, A; MORALES, G; PAULONE, I; GIRALDEZ, E; CANDIOTI, C; RIPOL, C. Entomological aspects of Chagas' disease transmission in the domestic habitat, Argentina. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 216-222, 2004.

CAVALCANTI, L.P.G; ROLIM, D.B; NETO, R.J.P; VILAR, D.C.L.V; NOGUEIRA, J.O.L; POMPEU, M.L; TEXEIRA, M.P; SOUZA, A.Q. Microepidemia de doenças de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. **Cad. Saúde. Coletiva**, v. 17, n.4, p. 911–921, 2009.

CAVALLO, M.J; AMELOTI, I; GORLA, D.E. Invasion of rural houses by wild Triatominae in the arid Chaco. **J Vector Ecol**.v. 41, n. 1, p. 97–102, 2016.

CERETTI, J.W; VENDRAMI, D.P; Gil, J.M; BARATA, J.M.S; MARELLI, M.T. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. **Rev. Bras. Entomol**, São Paulo, v. 52, n. 3, Setembro, 2008.

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

COSTA, J; DORNAK, L.L; ALMEIDA, C.E; PETERSON, T. Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex t presente and under scenarios of future climate conditions. **Parasit Vectors**, v.7:238, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-238.

COURA, J.R; VINÃS, P.A; JUNQUEIRA, C.V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem Inst Osw Cruz**. v.109, n.7, p. 856–862, Novembro, 2014.

DIAS, J.C.P. Aspectos políticos em doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.28, supl.3, p. 41-45, 1995.

DIAS, J.C.P; COURA, JR; org. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1997. 486 p.

DIAS, J.C.P; SCHOFIELD, C.J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 4, p. 373-383,1998.

DIAS, J.C.P; PRATA, A; SCHOFIELD, J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 35, n. 6, p. 669-678, Dezembro, 2002 .

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.10, p. 2020-2021, 2006.

DIAS, J.C.P. Human Chagas Disease and Migration in the Context of Globalization: Some Particular Aspects. **J Trop Med**, 2013 (2013), Article ID 789758, 9 p.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/789758>

DIAS, J.C.P. Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 193-202. 2015. doi: 10.1016/j.gheart.2015.06.003.

DIOTAIUTI L. O risco de domiciliação de novas espécies de triatomíneos. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.33, n.2, p. 31-35, 2000.

DIRZO, R; YOUNG, H.S; GALETTI, M; CEBALLOS, G; ISAAC, N.J.B; COLLEN, B. Defaunation in the Anthropocene. **Science**. v. 345, n.6195, p.401-406, 2014.

DUJARDIN, J.P. Introducción a la morfometria con énfasis en Triatominae y Phlebotominae. European Community and Latin American Network for Research on the Biology and Control of Triatominae/ECLAT. 1999. Disponível em: <http://eclat.fcien.edu.uy>.

DUJARDIN, J.P; STEINDEL, M; CHAVEZ, T; MACHANE, M; SCHOFIELD, C.J. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n.4, p. 565-569, 1999.

DUJARDIN, J.P. **Los vectores de La Enfermedad de Chagas**. Bruxelles (Belgique): Académie Royale des Sciences d'Outre Mer, Clas dès Scie Nat et Méd, nouv. sér; 25, 2002. 189 p.

DUJARDIN, J.P; BEARD, C.B; RYCKMAN, R. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triaminae, vectors of Chagas disease. **Infect Genet Evol.** v.7, n. 2, p.161-167, 2007. Epub 2006 Sep 1.

DUJARDIN, J.P; KABA, D; SOLANO, P; DUPRAZ, M; MCCOY, K.D; JARAMILLO-O, N. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies. **Infect Genet Evol.** v.28, p. 704-714, 2014. doi: 10.1016 / j.meegid.2014.07.035. Epub 2014 09 de agosto.

FERREIRA, R.T.B; BRANQUINHO, M.R; LEITE, P.L. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Rev. VISA em Debate**, v.2, n.4, p. 4-11, 2014.

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.14, n.3, p. 265-299, 1980.

FORNEL, R. **Estudo da variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica**. Dissertação (Mestrado). Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GALDINO, A. S.; LIMA, J. P.M. S.; ANTUNES PANARARI, R. et al. Caracterização molecular de acessos de *Cratylia argentea* e sua relação filogenética com outras leguminosas. **Pesq. Agropec. Bras**; Brasília, v. 45, n. 8, p. 846-854, 2010.

GALLIARD, H. Recherches sur les réduvidés hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. IV - Organes génitaux femelles. **Ann Parasitol Hum Comp.**, v. 13, p. 497-527, 1935.

GALVÃO, C; JUBERG, J; CARVALHO, R.U; SEGURA, M.A.C; GIRON, G.I; CASAS, S.C.C. Distribuição Geográfica e Dispersão Alti-latitudinal de Alguns Gêneros e Espécies da Tribo *Triatomini* Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 33-38, 1998.

GALVÃO, A.C. A sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. **Entomol. Vectors**, Rio de Janeiro, v.10, n.4, p. 511-530, 2003a.

GALVÃO, C; CARCAVALLO, R; ROCHA, D.S; JURBERG, J. Checklist of the current valid species of the subfamily *Triatominae* Jeannel, (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, 202, p. 1-36, 2003b.

GALVÃO, C (org). **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: Soc Bra de Zoo, Zoo: guias e manuais de identificação series, 2014. 289 p.

GARDIM, S; ROCHA, C.S; ALMEIDA, C.E; TAKIYA, D.M; SILVA, M.T.A; AMBRÓSIO, D.L; CICALLELLI, M.B, ROSA, J.A. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex the endemic *Triatoma* in central-western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.89, n.4, p. 766–774, 2013.

GARDIM, S; ALMEIDA, C.E; TAKIYA, D.M; OLIVEIRA, J; ARAÚJO, R.F, CICALLELLI, R.M.B; ROSA, J.A. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. **Infect Genet Evol.**, p.74-79, 2014. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.01.024. Epub 2014 Feb 4.

GASCON, J; BERN, C; PINAZO, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop.** v.115, p. 22–27, 2010.

GONÇALVES, T.C.M, TEVE-NEVES, S.C; SANTOS-MALLET, J.R; CARBAJAL-DE-LA-FUENTE.A.N; LOPES, C.M. *Triatoma jataí* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.108, p. 429–437, 2013.

GONÇALVEZ-BRITEZ, N.E; CARRASCO, H.J; PURROY, C.E.M; FELICIANGELI, M.D; MALDONADO, M; LÓPEZ, E; SEGOVIA, M.J; ARIAS, R.J. Genetic and morphometric variability of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the eastern and western regions of Paraguay. **Frontiers Public Health Epid.** v.2, Article 149, 2014. 9p.

GORLA, D.E; JURBERG, J; CATALÁ, S.S; SCHOFIELD, C.J. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 329-385, Setembro, 1993.

GUMIEL, M; CATALÁ, S; NOIREAU, F; ARIAS DE ROJAS, A; GARCIA, A; DUJARDIN, J.P. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez. Olmedo e Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). **Syst Entomol**, v.28, p. 173-179, 2003.

GURGEL, G.R. **Filogeografia, morfometria e distribuição geográfico potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil**. Tese (Doutorado). Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

GURGEL, G. R; FERREIRA, J.B.C; A.F. ROSA; BAR, M.E; GALVÃO, C. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. **Med Vet Entomol**, v.25, p. 84-93, 2011.

HEYMANN, D.L; CHEN, L; TAKEMI, K.T; FIDLER, D.P; TAPPERO, J.W; THOMAS, M. J; FRIEDEN, T.R; NISHTAR, S; KALACHE, A; OLLIARO, P.L; TORREELE, E; HORBY, P; GOSTIN, L.O; NDOMONDO-SIGONDA, M; CARPENTER, D; RUSHTON, S; LILYWHITE, L; DEVKOTA, B; KOSER, R; YATES, R; DHILON, R.S; RANNAN-ELIYA,R. Global health security: the wider lessons from the west African Ebola virus disease epidemic. **Lancet**, v.385, p. 1884–1890, 2015.

HILLS, D.M. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Ann Rev Ecol Syst**, v.18, p. 23–42, 1987.

HILLS, D.M; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quart Rev Biol**, v. 66, n. 4, p. 411-453, Dezembro, 1991.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

FOLMER, O; BLACK, M; HOEH, W; LUTZ, R; VRINJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**, v, 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser.** v.41, p. 95-98, 1999.

HUELSENBECK, J.P.; ROQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic tress. **Bioinformatics**, v.17, p. 754-755, 2001.

HYPISA, V; TIETZ, D.F; ZRZAVÝ, J; REGO, R.O.M; GALVÃO, C; JURBERG, J. Philogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol Physiol Evol**, v.23, p. 447–457, 2002.

IBARRA-CERDEÑA, C.N; CORDERO-SÁNCHEZ, V; TOWNSEND, P.A; RAMSEY, J.M. Ecology of Norty American Triatominae. **Acta Trop**, v.110, n.2-3, p.178-186, 2009.

IMAI, K; MAEDA, T; SAYAMA, Y; OSA, M; MIKITA, K; KURANE, I; MIYAHIRA, Y; KAWANA, A; MIURA, S. Chronic Chagas disease with advanced cardiac complications in Japan: Case report and litarature rewiew. **Parasitol Int**, v.64, p. 240–242, 2015

JARAMILLO, O.N; CASTILLO, D; WOLF, E.M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 667-673, 2002.

JURBERG, J; LENT, H; GALVÃO, C. **The male genitalia and its importance in taxonomy. Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998.

JURBERG, J; GALVÃO, C; LENT, H; MONTEIRO, F; LOPES, M.C; PANZERA, F; PÉREZ, R. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prozen & Ronderos, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). **Entomol Vectors**, v.5, n.3, p. 107-122, 1998.

JURBERG, J; GALVÃO, C; NOIERAU, F; CARCAVALLO, R.U; ROCHA, D.S; LENT, H. Uma iconografia dos triatomíneos (HEMIPTERA: REDUVIIDAE). **Entomol Vectors**,v.11, n.3, p. 457-494, 2004.

JURBERG, J; ROCHA, D.S; GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guittonand Miles, 1977 (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). **Biota Neotrop.**, v.9, p. 123–128, 2009.

JURBERG, J; CUNHA, V; CAILLEAUX, S; RAIGORODSCHI, R; LIMA, M.S; ROCHA, D.S; MOREIRA; F.F.F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. of the *Triatoma rubrovaria* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Rev Pan-Am Saúde**, v.4, p. 43–56, 2013.

JUSTI, S.A; RUSSO, C.A.M; MALLET, J.R.S; OBARA, M.T; GALVÃO, C. Molecular Phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasit Vectors**, v. 7:149, 12p. 2014. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/149>.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v.16, p. 111-120, 1980.

KLINGENBERG, C.P; McINTYRE, G.S. Geometric morphometric of developmental instability: Analyzing pattern of fluctuating asymmetry with Procrustes Methods. **Evolution**, v.52, p.1363-1375, 1998.

KLINGENBERG, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Mol Ecol Resour**, v.11, p. 353-357, 2011.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software versão 7.0.14. 2015. Molecular biology and evolution, msw054. (Distribuído pelos autores).

LENT, H e JURBERG, J. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Triatominae). **Rev Bras Biol.**, v.25, n.4, p. 349-376, 1965.

LENT, H e JURBERG, J. Algumas informações sobre *Triatoma spinolai* Porter, 1934, com estudo sobre a genitália externas (Hemiptera – Reduviidae). **Rev Bras Biol**, v.27, n.3, p. 273 – 288, 1967.

LENT, H; JURBERG, J. O gênero *Rhodnius* com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Rev Bras Biol**, v.29, p. 487-560, 1969.

LINO.Z. R. J; JUVENTINO, L.J; RAÚL, R;G; ESTIBALIZ, S. Lethal effects of a Mexican *Beauveria Bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). **Braz J Microbiol.**, v.45, n.2, p. 551–557. 2004.

LOZA-MURGUIA, M; NOIREAU, F. Vectorial capacity of *Triatoma guasayana* (Wygodzinsky & Abalos) (Hemiptera: Reduviidae) compared with two other species of epidemic importance. **Neotrop Entomol.**, Londrina, v.39, n. 5, p. 799-809, 2010.

MARCILLA, A; BARGUES, M.D; RAMSEY, J.M; MAGALLON-GASTELUM, SALAZAR-SCHETTINO, P.M; ABAD-FRANCH, F. The ITS-2 of the Nuclear rDNA as a Molecular Marker for Populations, Species, and Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors Chagas Diseases. **Mol Phylogenet Evol.** v.18, p. 136-142, 2002.

MÁRQUEZ, E; O-JAMILLO, N; PALACIO-GÓMEZ, A; DUJARDIN, J.P. Morphometric and molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form from *R. robustus* Lrousse, 1927 and *R. prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). **Acta Trop.** v.120, p.103–109, 2011.

MONTEIRO, L; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica**. São Paulo: Holos Ed., 1999. 188 p.

MONTEIRO, F.A.; BARRET, T.V.; FITZPATRICK, S.; CORDON-ROSALES, C.; FELICIANGELI, D.; BEARD, C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius Prolixus* and *R. robustus*. **Mol Ecol.**, v. 12, 4, p. 997-1006, 2003.

MONTEIRO, F.A; ABAD-FRANCH, F. Molecular research and control of Chagas disease vectors. **An Acad Bras Ciênc.**, v.77, n.3, p. 437-454, 2005.

MORAES, D.A. **A Morfometria Geométrica e a “Revolução na Morfometria”: localizando mudanças na forma dos organismos**. São Paulo: USP, Departamento de Biologia, 2003. (Instituto de Biociências, Boletim. A III, n. 3, 2003).

MORETTI, E; BASSO, B; CASTRO, I; PAEZ, M.C; CHAUL, M; BARBIERI, G; FEIJOO, D.C; SARTORI, M.J; PAEZ, R.C. Chagas disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 1, p. 53-55, 2005.

NOIREAU, F; GUTIERREZ, T; ZEGARRA, M; FLORES, R; BRENIÈRE, F; CARDOZO, L; DUJARDIN, J.P. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from Bolivian Chaco. **Trop Med Int Health.**, v.3, n.5; p. 364-372, 1998.

NOIREAU; DUJARDIN, J.P. L. Biology of Triatominae. Amer Try Cha Dis. 2010. Não encontrei esta referência nas bases de dados da área médica.

NOYA, B.A; DÍAZ-BELLO, Z; COLMENARES, C; RUIZ-GUEVARA, R; MAURIELLO, L; MUÑOZ-CALDERÓN, A; NOYA, O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela, epidemiological clinical and diagnostic approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.110, n.3, p. 377–386. Maio, 2015.

OBARA, T.M; BARATA, J M S; SILVA, N.N; CERETTI, J.R.W; URBINATTI, P.R, ROSA J.A; JURBERG, J; GALVÃO, C. Estudo de ovos de quatro espécies do género *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vetores da doença de Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, p. 13-19. 2007.

OBARA, M.T; OTRERA, V.C.G; GONÇALVES, R.G; SANTOS, J.P; SANTALUCIA, M; ROSA, J.A; ALMEIDA, P.S; BARATA, J.M.S. Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) ao inseticida deltametrina, na região Centro-Oeste do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 206-212, Abril, 2011.

OLIVEIRA, J; MEDONÇA, V. J; ARAÚJO, R.N; NASCIMENTO, E.L; ROSA. Biological, morphological and morphometric studies of *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 4012, n.3, p. 514–524, Julho, 2015.

PANZERA, F; HORNOS, S; PEREIRA, J; CESTAU, R; CANALE, D; DIOTAIUTI, L; DUJARDIN, J.P; PEREZ, R. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). **Am J Trop Med Hyg.** v.57, n.6, p. 732-739, 1997.

PANZERA, F; PITA, S; NATTERO, J; PANZERA, Y; GALVÃO, C; CHAVEZ, T; ARIAS, A.R; TÉLLEZ, L.C; NOIREAU, F. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. **Parasit Vectors**, v. 8:485. 2015. DOI 10.1186/s13071-015-1109-6.

PEREIRA, K.S; SCHMIDT, F.L; GUARALDO, A.M.A; FRANCO, R.M.B; DIAS, V.L; PASSOS, L.A.C. Chagas Disease as a Foodborne Illness. **J Food Protect.**, v. 72, n. 2, p. 441– 446, 2009.

PÉREZ, R; HERNÁNDEZ, M; QUINTEIRO, O; SCVORTZOFF, E; CANALE, D; MÉNDEZ, L; COHANOFF, C; MARTINO, M; PANZERA, F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). **Genética.**, 125, n. 2-3, p. 261–270, 2005.

PITA, S; LORITE, P; NATERRO, J; GALVÃO, C; ALEVI, K.C.C; TEVES, S.C; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V; PANZERA, F. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera- Triatominae). **Infec Gen Evol**, v.43, p. 225-231, 2016.

POINAR, J.G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stereocoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.5, p. 72-81, 2005.

POINAR, J.G. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. **Palaeodiversity**, v.6, p. 1–8, 2013.

PORTER, C.H; COLLINS, F.H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera:Culicidae). **Am J Trop Med Hyg**, v.45, p. 271-279, 1991.

PFEILERR, E; BITLER, B.G; RAMSEY, J.M; PALACIOS-CARDIEL, C; MARKOW, T.A. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), from the Sonoran desert, insect vector of the Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. **Mol Phylogenet Evol.**, v.41, p. 209-221, 2006.

REBAGLIATI, P; PAPESCHI, A.G; MOLA, L.M; PIETROKOVSKY, S; GAJATE, P; BOTTAZI, V; WISNIVESKEY-COLLI, C. Comparative Meiotic Studies in *Triatoma sordida* (Stål) and *Triatoma guasayana* Wygodzinsky & Abalos (Reduviidae, Heteroptera). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 309-315, Maio, 1998.

RIBEIRO, A.R; MENDONÇA, V.J; ALVES, R. T; MARTINEZ, I; ARAÚJO, R.F; MELLO, F; ROSA, J. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.48, n.2, 2014.

ROHLF, J; MARCUS, L.F. A revolution in morphometrics. **Trends Ecol Evol.**, v. 8, n. 4. p. 129-132, Abril, 1993.

ROHLF, F. Shape Statistics: Procrustes Superimpositions and Tangent Spaces. **J Classif.** v.16, p. 193-223, 1999.

ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S.; BARELLI, N. SANTOS, J. L. F. & BELDA NETO, F. M. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.87, p. 257-264, 1992.

ROSA, J. A; BARATA, J. M. S; CILENSE, M. & BELDA NETO, F. M. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **Int J Insect Morphol Embryol.**, v.28, p. 363-375, 1999.

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

ROSA, J.A; JUSTINI, H.G.H; BARATA, M.S.J. Differences in the size of eggshells among three *Pangstrongylus megistus* colonies. **Rev Saúde Pública.**, v. 37, n.4, p. 528-530, 2003.

ROSA, J.A; MEDEIROS, M.P; CILENSE, M; BARATA, J.M.S. Morphological study of the thorax of the nymphal instars of *Triatoma arthurnevai* Lent e Martins (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Rev Bras Entomol.**, v.49, n.3, p. 289-293, setembro, 2005.

ROSA, J.A; MENDONÇA, V.J; ROCHA, C.A; GARDIN; CILENSE, M. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, n.3, p. 286-292, Maio, 2010.

ROSA, J.A, ROCHA, C.S, GARDIM, S, PINTO, C.M, MENDONÇA, V.J; FILHO, J.C.R, CARVALHO. Description of *Rhodnius montenegrensis* ssp.n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state Rondônia Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, p. 62–76, 2012.

ROSA, J.A; MENDONÇA, V.J; GARDIM, S; CARVALHO, D.B; OLIVEIRA, J; NASCIMENTO, J.D; PINOTTI, H; PINTO, M.C; CILENSI, M; GALVÃO, C; BARATA, J.M.S., E.O.C; OLIVEIRA, J; NASCIMENTO, J.D; CILENSI, M; ALMEIDA, C.E. Study of

the external female of genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. **Parasit Vectors**, v.7:17, 2014. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/17>

ROSSI, J.C.N; DUARTE, E.C; GURGEL, R.C. Factors associated with the occurrence of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in rural localities of Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n.2, p.192-200, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS T. Transfer of DNA from agarose gels to solid supports. In: ----. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.2, cap.9, p. 9.34-9.37.

SCHACHTER-BROIDE, J; DUJARDIN, J.P; KILTRON, U; GURTLE, R.R. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) population from Northwestern Argentina using wing geometric morphometry. **J Med Entomol**, v. 41, n.4, p. 643-649, 2004.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, Suppl 1, p.75-85. 2007.

SCHOFIELD, C. J; JANNIN, J; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol**, v.22, p. 583-588, 2006.

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

SILVEIRA, A.C. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 44, supl. 2, p. 122-14, 2011.

SILVEIRA, B. E. **Morfometria geométrica comparative de asas de Sacophagidae (Diptera) de interesse forense: uma ferramenta de indentificação?** Dissertação (Mestrado). Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SOUZA, E. S; ATZINGEN, N.C.B; FURTADO, M.B; OLIVEIRA.J; NASCIMENTO, J.D; VENDRAMI, D.P; GARDIM, S; ROSA, J.A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Triatominae) from Pará State, Brazil. **ZooKeys**, v. 621, p. 45–62, 2016.

SOTO, H; TIBADUIZA, T; MONTILLA, M; TRIANA, O; SUÁREZ, D.C; TORRES, M.T; ARIAS, M.T; LUGO, L. Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.30, n.4, p. 746-756. Abril, 2014.

STAL, C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. **Berliner Entomologische Zeitschrift**, v.3, p. 99-117, 1859.

TARLETON, R.L; GURTNER, R.E; URBINA, J.A; RAMSEY, J; VIOTTI, R. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. **PLoS. Negl. Trop Dis.** v.8, n.10,e3219, Outubro, 2014.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n.22, p. 4673-4680, 1994.

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

VILLEGAS, J; FELICIANGELI, M.D; DUJARDIN, J.P. Wing shape divergence between *Rhodnius robustus*, from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* form Mérida (Venezuela). **Infect Genet Evol.** v.2, n.2, p.121-128, 2002.

VISCIARELLI, E; FERRERO, A; COSTAMAGNA, S. Aspectos exocoriales de huevos de *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929 por microscopía electrónica de barrido. **Entomol Vectores**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 653-668, 2004.

WYGODZINSKY, P; ABALOS, J.W. *Triatoma guasayana* sp. n. (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera.) **Semana Medica**, Buenos Aires, v. 56, supl.B 2920, p. 2, 1949.

WHO – World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 14 out. 2015a.

WHO – World Health Organization. Neglected tropical diseases. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 02 fev. 2015b.

WISNIVESKY-COLLI, C; VEZZANI, D; PIETROKOVSKY, S.M; SCURTI, H; IRIARTE, J. Ecological characteristics of *Triatoma patagonica* at the Southern limit of its distribution (Chubut, Argentina). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.8, p. 1077-1081, 2003.

Carta de submissão artigo.

Dear Dr. Tiago Belintani

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Acta Tropica

Corresponding Author: Carlos Almeida

Co-Authors: Jader Oliveira; Paula Marcet; Daniela M Takiya; Vagner Mendonça; Tiago Belintani; Maria D Bargues; Lucia Mateo; Vivian Chagas; Elaine Folly-Ramos; Pedro Cordeiro-Estrela; Rodrigo Gurgel-Gonçalves; Jane Costa; João A Rosa;

Title: Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at almeida_ce@hotmail.com; almeidacaredu@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/actrop/l.asp?i=73860&l=LEP0LYFP>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Acta Tropica